

## **AGGIORNAMENTO EPIDEMIOLOGICO SUL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA IN EUROPA OCCIDENTALE**

Legnardi M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Tonellato F.R.<sup>2</sup>, Koutoulis K.C.<sup>3</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italia*

<sup>2</sup> *CEVA Salute Animale Italia, Viale Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB)*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Malattie Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università della Tessaglia, Trikalon 224, 43100 Karditsa, Grecia*

### **Summary**

Infectious bursal disease virus (IBDV) is a highly variable RNA virus that is responsible of an immunosuppressive disease of chickens known as infectious bursal disease (IBD). Despite the significant burden of IBD, the subclinical nature of the infection caused by many of the currently circulating IBDV types means that viral presence is easily overlooked, thus requiring a scrupulous monitoring to fully understand IBDV epidemiology. Accordingly, the present study has been performed to provide an update on the IBDV epidemiological scenario in Western Europe by considering the results of diagnostic activities performed throughout 2021 on bursal samples collected in nine different countries. In total, 393 out of 470 samples tested positive. When a field strain was detected, further investigations were carried out, allowing to obtain high-quality sequences of portions of both genome segments for 113 viruses. Three types of field strains were subsequently characterized following a phylogeny-based classification scheme: in detail, 116 strains found in Belgium, Denmark, France, Germany, the Netherlands, Portugal and the United Kingdom were labeled as reassortants with a very virulent-like VP2 and a classical-like VP1 (genotype A3B1) and were highly similar to strains that have been reported since 2017 in several North-Western European countries. Eleven additional A3B1 strains were found in Italy, but clustered separately from other European countries and together with viruses whose presence was only ever signaled in Russia, Kazakhstan and the Middle East. Lastly, 15 strains detected in Portugal belonged to the recently described A9B1 genogroup, confirming its circulation at local level.

Despite almost all samples came from vaccinated flocks, the obtained results show that field IBDVs are circulating extensively in all the investigated countries but Spain, and that the North-Western European reassortant strains have rapidly affirmed themselves as the dominant field threat in the region. These findings demand for attentive monitoring activities to be conducted in these and other countries, along with research efforts to better understand the pathogenic and antigenic features of the detected strains and thus their actual clinical and economic impact.

### **INTRODUZIONE**

La bursite infettiva (IBD), anche nota come malattia di Gumboro, è una patologia

virale immunosoppressiva dal notevole impatto sanitario ed economico sull'avicoltura mondiale, ascrivibile sia a focolai caratterizzati da sintomi aspecifici e elevata mortalità che alle conseguenze dell'immunosoppressione, come l'aumento dell'incidenza di infezioni secondarie e di fallimenti vaccinali e il peggioramento dell'indice di conversione alimentare (Alkie & Rautenschlein, 2016). L'agente eziologico della malattia è noto come virus della bursite infettiva (IBDV) e appartiene al genere *Avibirnavirus* della famiglia *Birnaviridae*. IBDV possiede un genoma a RNA a doppio filamento composto di due segmenti, denominati A e B. Il segmento A codifica per la proteina capsidica (VP2), una proteina *scaffold* (VP3), una proteasi (VP4) e una proteina non strutturale (VP5), mentre il segmento B codifica per la RNA polimerasi RNA-dipendente (VP1) (Maraver et al., 2003). Tra le proteine virali, la VP2 risulta essere quella più studiata per via del suo ruolo di principale determinante antigenico e patogenetico (Brandt et al., 2001). Ciononostante, è stato dimostrato come anche la VP1 concorra alla determinazione della patogenicità (Escaffre et al., 2013). Per questo motivo, e per via della rilevanza dei fenomeni di riassortimento per l'evoluzione di IBDV, diverse combinazioni dei due segmenti possono esitare in significative differenze patobiologiche (He et al., 2016; Chen et al., 2018).

Sono noti due sierotipi di IBDV, denominati 1 e 2. Il sierotipo 1 è l'unico a causare la malattia ed è tradizionalmente suddiviso sulla base di differenze antigeniche e patogenetiche. I tre sottogruppi storicamente considerati più rilevanti sono rappresentati dai ceppi classici, i primi ad essere identificati e responsabili della sintomatologia comunemente attribuita ad IBD; i ceppi varianti, caratterizzati da un diverso profilo antigenico e associati a infezioni a carattere subclinico accompagnate da una marcata atrofia della borsa di Fabrizio; e i ceppi *very virulent*, che al contrario risultano antigenicamente affini a quelli classici, ma marcatamente più virulenti (Etteradossi & Saif, 2020). Al giorno d'oggi, tuttavia, questa classificazione appare sempre più obsoleta e inadeguata a descrivere in modo esaustivo la crescente variabilità esistente tra i diversi ceppi di IBDV (Jackwood et al., 2018). Essa risulta inoltre di difficile applicazione per via dell'ampio ricorso, nell'ambito della diagnosi routinaria di IBD, a metodiche di biologia molecolare, che non permettono una valutazione diretta né della patogenicità né dell'antigenicità. Ciò ha portato alla necessità di dotarsi di sistemi di classificazione più standardizzati e basati sulla filogenesi. Al momento ne sono disponibili tre: il primo, proposto da Michel & Jackwood (2017), prende in considerazione una porzione del gene della VP2, dividendo il sierotipo 1 in 7 diversi genogruppi. I rimanenti due schemi di classificazione, proposti da Islam et al. (2021) e Wang et al. (2021), considerano anche una parte del gene della VP1, permettendo l'identificazione di eventi di riassortimento e riconoscendo, con ottima ma non completa sovrapposizione, 9 genogruppi a livello di segmento A e 5 a livello di segmento B. Combinando le due classificazioni in genogruppi, si ottiene inoltre una classificazione composita in genotipi. Successivamente alla proposta di questi tre sistemi di classificazione, un nuovo gruppo di ceppi di IBDV con peculiarità uniche a livello di gene della VP2 è stato identificato in Portogallo (Legnardi et al., 2022), aumentando quindi il computo totale di genogruppi/genotipi.

Per via dell'elevata contagiosità e resistenza a livello ambientale di IBDV, il controllo della malattia non può prescindere da rigorose pratiche di biosicurezza e

dall'applicazione della vaccinazione. Le strategie vaccinali ad oggi disponibili includono un'ampia gamma di vaccini vivi attenuati, basati su ceppi a diversa virulenza residua, vaccini vettorizzati e ad immunocomplessi, i quali possono differire per vie e tempistiche di somministrazione (Muniz et al., 2018). Indipendentemente dalla strategia adottata, il controllo di IBDV dovrebbe comunque prevedere l'allestimento di un solido sistema di monitoraggio che consenta di identificare, caratterizzare e combattere efficacemente eventuali minacce epidemiologiche. Coerentemente con questi principi, questo studio si pone come obiettivo quello di fornire, utilizzando gli strumenti offerti dai moderni sistemi di classificazione, un aggiornamento epidemiologico sulla situazione di IBDV in Europa occidentale.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Il presente studio è basato sui risultati delle attività di diagnostica molecolare svolte nel corso del 2021 dal laboratorio di microbiologia e malattie infettive del dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università di Padova. In particolare, sono stati presi in considerazione tutti i campioni ricevuti da paesi dell'Europa occidentale per la ricerca di IBDV tramite indagini molecolari, conferiti in forma di *pool* di 4-10 borse di Fabrizio tal quali o impresse su FTA<sup>o</sup> card.

### *Processazione dei campioni ed estrazione dell'RNA virale*

I *pool* conferiti su FTA<sup>o</sup> card sono stati processati tagliando frammenti di ugual dimensione per ognuno dei singoli campioni e trasferendoli in un'unica provetta da 2 mL. Dopo l'aggiunta di 1.5 mL di soluzione PBS 1x, i campioni sono stati vortexati per 30 sec. I *pool* di borse tal quali sono invece stati uniti in una provetta Falcon da 50 mL contenente 10 mL di soluzione PBS 1x e vortexati per 30 sec. Gli acidi nucleici sono stati estratti da 200 mL di ciascun eluato usando il kit *High Pure Viral Nucleic Acids* (Roche<sup>o</sup>) secondo le istruzioni del produttore. Sia gli eluati che gli estratti sono stati conservati a -80°C per archivio e ulteriori analisi.

### *Analisi molecolari*

Una porzione del gene della VP2 è stata amplificata tramite RT-PCR *one-step*, impiegando i *primer* 743-1 (5' -GCCAGAGTCTACACCAT-3') e 743-2 (5'-CCCGGATTATGTCTTTGA-3') (Jackwood & Sommer-Wagner, 2005). In caso di risultato positivo, si è proceduto con il sequenziamento con metodo Sanger, eseguito con entrambi i *primer*. Successivamente, i campioni in cui venivano identificati ceppi di campo, classificati come tali sulla base della distanza genetica da ceppi vaccinali di referenza, sono stati sottoposti a ulteriori indagini per caratterizzare una parte del gene della VP1 utilizzando due RT-PCR sovrapposte, basate sulle coppie di *primer* B-Univ-F (5'-AATGAGGAGTATGAGACCGA-3')/B-Univ-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3') (Islam et al., 2011) e 66 (5'-ATCCTTGACGGCACCCTT-3')/67 (5'-CCCGGATTATGTCTTTGA-3') (Ruud et al., 2002). Tutte le RT-PCR sono state eseguite con il kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™).

### *Analisi filogenetiche*

I cromatogrammi ottenuti tramite sequenziamento Sanger sono stati valutati visivamente e sottoposti a *trimming* usando 4peaks (Nucleobytes B.V.), per poi essere assemblati in sequenze consenso con ChromasPro (Technelysium Pty Ltd). La classificazione è stata condotta su base filogenetica basandosi sui criteri proposti da Islam et al. (2021). A tal scopo, due dataset, uno per il gene della VP2 e l'altro per quello della VP1, comprendenti i ceppi sequenziati assieme a sequenze di referenza reperite da GenBank, sono stati allineati con metodo MUSCLE (Edgar et al., 2004) e trimmati ad una lunghezza standard. I rispettivi alberi filogenetici sono stati quindi costruiti in Mega X (Kumar et al., 2018) con metodo *Maximum Likelihood* (1000 *bootstrap*) e scegliendo il modello di sostituzione più appropriato sulla base del valore di *Bayesian information criterion* (BIC) calcolato con jModelTest (Darriba et al., 2012). Solo i ceppi per cui erano disponibili porzioni di entrambi i segmenti sono stati inclusi nei dataset definitivi.

Ulteriori analisi sono state condotte per *clade* di ceppi di campo ritenuti rilevanti. Dopo aver individuato i ceppi di interesse, le 250 sequenze a maggior omologia a livello sia di VP2 che di VP1 sono state ottenute da GenBank e allineate al relativo subset, per poi condurre indagini filogenetiche esplorative. Gli alberi costruiti sulla base dei due segmenti sono stati quindi comparati per determinare che entrambi i segmenti di un dato ceppo (se disponibili) ricadessero nella rispettiva *clade* di interesse.

## **RISULTATI**

### *Campionamento*

Nel corso del 2021 sono stati conferiti 470 campioni da 9 paesi dell'Europa occidentale. In particolare, 15 campioni provenivano dal Belgio, 6 dalla Danimarca, 133 dalla Francia, 38 dalla Germania, 37 dall'Italia, 17 dai Paesi Bassi, 76 dal Portogallo, 128 dal Regno Unito (Inghilterra e Irlanda del Nord) e 20 dalla Spagna. Informazioni relative alla categoria produttiva sono state ottenute per 464 campioni, di cui 414 (89,2%) erano stati prelevati da gruppi di broiler, 49 (10,6%) da ovaiole e un solo campione (0,2%) da riproduttori. Il protocollo vaccinale era invece noto per 420 campioni, di cui 216 (51,4%) provenivano da animali vaccinati con uno o più vaccini vivi, mentre i vaccini vettorizzati e ad immunocomplessi erano stati somministrati rispettivamente in 56 (13,3%) e 148 (35,3%) gruppi di animali.

### *Analisi molecolari e filogenetiche*

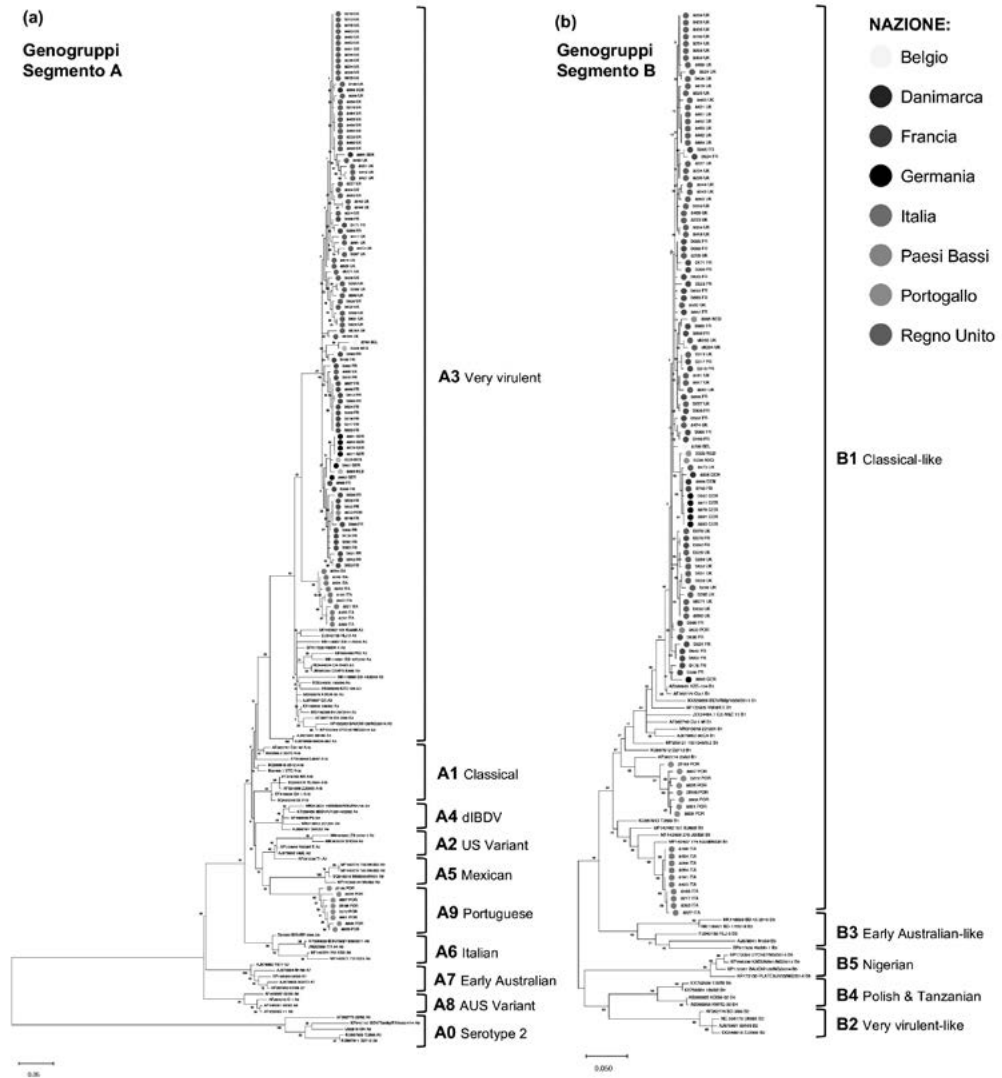
Le indagini molecolari aventi come target una porzione del gene della VP2 hanno evidenziato 393 (83,6%) positività a fronte di 77 campioni (16,4%) negativi. Sequenze di adeguata qualità sono state ottenute per 386 campioni: 243 di esse si sono dimostrate appartenere al genogruppo A1 (*Classical*) e la loro origine è stata caratterizzata come vaccinale; 11 sequenze, anch'esse considerate vaccinali (*V877-like*), sono ricadute all'interno del genogruppo A7 (*Early Australian*); 117 sequenze appartenevano al genogruppo A3 (*Very virulent*) e 15 al genogruppo A9 (*Portuguese*). I risultati completi sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1.** Risultati delle indagini diagnostiche basate sul sequenziamento di parte del gene della VP2.

Paese	Positivi	Ceppi vaccinali		Ceppi di campo		Positivi non sequenziabili	Negativi
		Genograppo A1	Genograppo A7	Genograppo A3	Genograppo A9		
Belgio	15	7	-	2	-	1	5
Danimarca	6	4	-	2	-	-	-
Francia	133	65	3	36	-	5	24
Germania	38	20	6	6	-	-	6
Italia	37	18	-	11	-	-	8
Paesi Bassi	17	8	-	4	-	-	5
Portogallo	76	36	1	3	15	-	21
Spagna	20	17	-	-	-	-	3
Regno Unito	128	68	1	53	-	1	5
Totale	470	243 (51,7%)	11 (2,3%)	117 (24,9%)	15 (3,2%)	7 (1,5%)	77 (16,4%)

Le 132 sequenze caratterizzate come A3 o A9 sono state considerate appartenenti a ceppi di campo e sottoposte a ulteriori analisi. Per 113 di questi ceppi è stato possibile ottenere le rispettive sequenze del gene della VP1, tutte ricadute all'interno del genograppo B1 (*Classical-like*). A livello di genotipo, 105 ceppi sono stati quindi classificati come A3B1 e 8 come A9B1 (Figura 1). I ceppi A9B1 provenivano tutti da campioni portoghesi, ed erano caratterizzati da una elevata omologia, con un'identità genetica media pari al 98.9% e 98.6% rispettivamente a livello di VP1 e VP2. Al contrario, i ceppi A3B1 potevano essere divisi in due sottogruppi. Tutti i virus ritrovati in Belgio, Danimarca, Francia, Germania, Paesi Bassi e Regno Unito, oltre a un ceppo proveniente dal Portogallo, formavano un'unica *clade* caratterizzata da un'identità genetica media del 98,7% e 97,8% a livello di VP1 e VP2, mentre i ceppi italiani formavano un secondo e ben definito cluster all'interno del medesimo genograppo (99,6% e 99,2% di identità genetica a livello di geni della VP2 e VP1). Alcuni dei ceppi italiani e portoghesi erano già stati riportati in precedenti lavori (Legnardi et al., 2021, 2022).

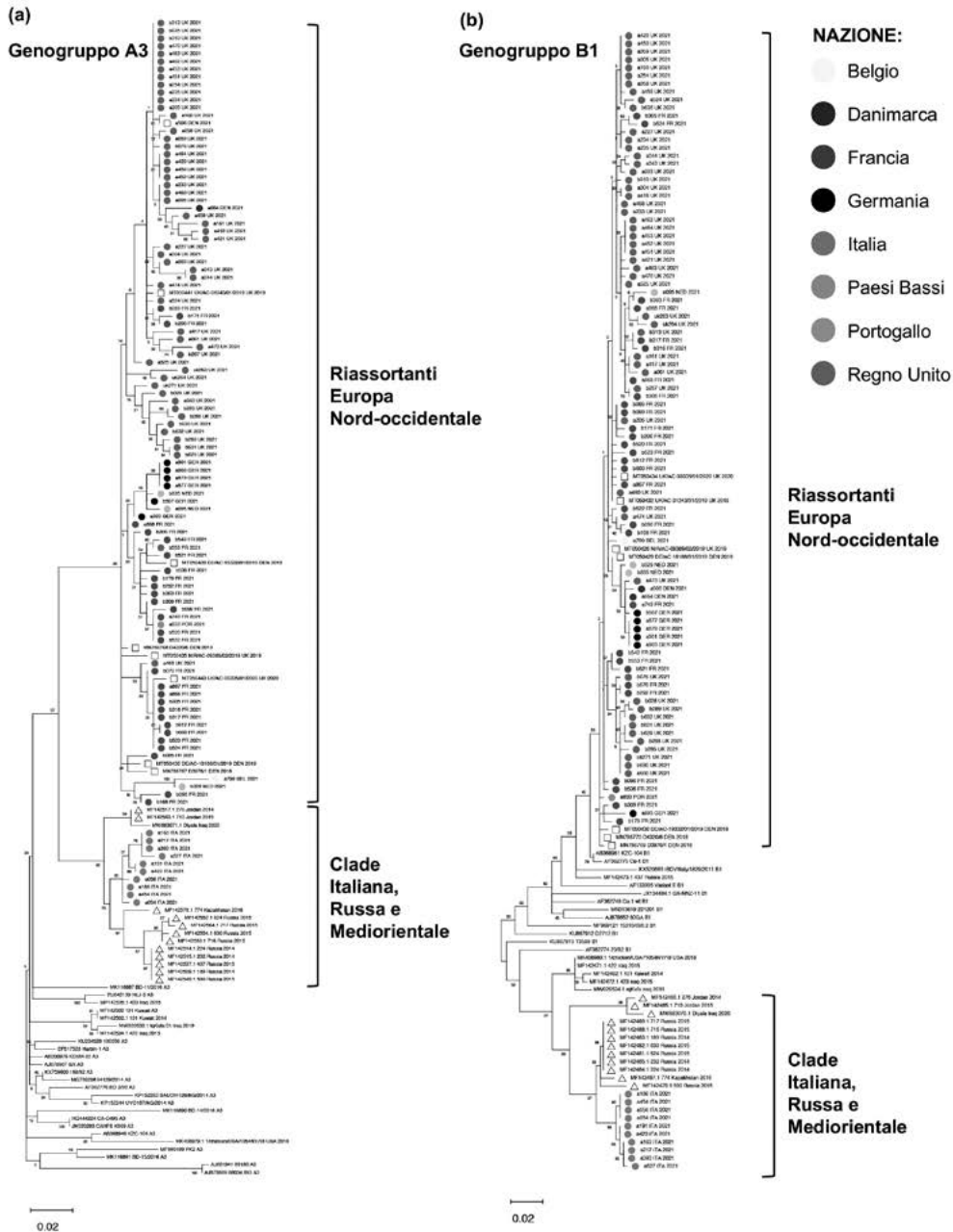
**Figura 1.** Classificazione filogenetica a livello di segmento A (a) e B (b) dei ceppi ritrovati nel presente studio, colorati in base al paese di ritrovamento. Gli alberi filogenetici sono stati inferiti con metodo *Maximum Likelihood* (1000 repliche). Per il segmento A, il segmento genomico considerato era di 366 nucleotidi, mentre per il segmento B era di 431 nucleotidi. I modelli di sostituzione utilizzati sono stati rispettivamente GTR+G e GTR+I+G.



Le due *clade* appartenenti al genotipo A3B1 sono state selezionate per ulteriori approfondimenti. Ciò ha portato all'identificazione, tramite ricerche effettuate in GenBank, di 12 ceppi caratterizzati da elevata omologia con i virus ritrovati in Italia, la cui presenza è stata riportata in Russia, Giordania, Kazakistan e Iraq tra il 2014 e il 2020 (Michel & Jackwood, 2017). Altri ceppi con analoghe caratteristiche a livello di VP1, ma con significative differenze nella VP2, sono stati invece segnalati in Kuwait, Iraq e gli Stati Uniti (Abbas et al., 2021; Michel & Jackwood, 2017; Michel et al., 2019) (Figura 2).

Per quanto riguarda i ceppi A3B1 ritrovati nel resto d'Europa, essi si sono dimostrati geneticamente affini a 7 virus identificati tra il 2018 e il 2020 in Danimarca e Regno Unito (Mató et al., 2020) (Figura 2). Questi ceppi risultavano caratterizzati come riassortanti aventi una VP2 *very virulent-like* e una VP1 ereditata da un ceppo classico attenuato di probabile origine vaccinale (Mató et al., 2020). Svareti altri ceppi olandesi, cechi, svedesi, belgi e tedeschi, sequenziati da Mató et al. (2020) e Van Borm et al. (2021) presentavano una elevata identità genetica a livello di gene della VP2, ma sono stati esclusi dall'analisi per via della mancata sovrapposizione delle rispettive sequenze del gene della VP1 al segmento considerato per la classificazione.

**Figura 2.** Alberi filogenetici dei genogruppi A3 (a) e B1 (b). Le sequenze reperite da GenBank, caratterizzate da elevata identità con la *clade* italiana sono identificate con un triangolo ( $\Delta$ ), mentre quelle omologhe a riassortanti dell'Europa Nord-Occidentale con un quadrato ( $\square$ ). Gli alberi filogenetici sono stati inferiti con metodo *Maximum Likelihood* (1000 replicati) e utilizzando il modello di sostituzione GTR+G.





## DISCUSSIONE

Per quanto la convenienza del campionamento prevenga rigorose stime sulla prevalenza, il frequente ritrovamento di ceppi di campo in otto paesi dell'Europa occidentale sui nove indagati, con la sola eccezione della Spagna, suggerisce un'imponente circolazione di IBDV nella regione considerata nell'arco del 2021. Comparando i risultati qui riportati con quelli di uno studio epidemiologico svolto con finalità e metodiche analoghe nel 2013 da De Wit et al. (2018), si scopre che il numero relativo di ceppi di campo ritrovati è passato in meno di 10 anni dal 3% (6 positività ascrivibili a ceppi di campo su un totale di 199 campioni) all'attuale 28% (132 positività su 470 campioni). La rilevanza sanitaria ed economica di questo apparentemente notevole aumento della pressione infettiva appare tuttavia di difficile determinazione. Da una parte, la grande maggioranza dei campioni risultava prelevata per finalità di monitoraggio routinario e in assenza di segni clinici. Dall'altra, è necessario considerare che molti dei genotipi di IBDV ad oggi circolanti appaiono associati a infezioni subcliniche, risultando quindi di più difficile rilevazione rispetto a ceppi più virulenti. Questo sembra essere vero *in primis* per i ceppi appartenenti al genotipo A3B1 ritrovati nella quasi totalità dei paesi considerati, rivelatisi geneticamente affini a virus riassortanti segnalati in Europa nord-occidentale a partire dal 2017 (Mató et al., 2020). Sulla base di prove di patogenicità svolte *in vivo*, questa tipologia di virus, apparentemente originati da un evento di ricombinazione tra un ceppo *very virulent* e un ceppo classico attenuato, si è dimostrata per l'appunto associata a infezioni subcliniche. Ciononostante, il rilevamento di una marcata atrofia della borsa di Fabrizio sembra suggerire una forte capacità immunosoppressiva (Mató et al., 2020). La rapida diffusione di questi riassortanti, documentata dai risultati ottenuti in questo studio, è tale da destare notevole preoccupazione, ma essi non rappresentano l'unica minaccia epidemiologica per la regione. La totalità dei ceppi A3B1 ritrovati in Italia è risultata infatti appartenente a una *clade* distinta e filogeneticamente vicina a ceppi russi, kazaki e mediorientali. Come già riportato da Legnardi et al. (2021), la circolazione di questi ceppi sul suolo italiano non sembra essere una novità, in quanto virus con caratteristiche genetiche e aminoacidiche compatibili, anche se originariamente considerati stipiti *very virulent*, sono stati identificati in molteplici studi svolti nell'ultimo decennio (Lupini et al., 2016; De Wit et al., 2018; Gambi et al., 2020). Un simile discorso vale anche per i virus di campo ritrovati in Portogallo, dimostratisi appartenere al genotipo A9B1. Nonostante la caratterizzazione di questo genotipo sia estremamente recente (Legnardi et al., 2022), ceppi con analoghe caratteristiche sono stati segnalati in Spagna nel 2009 e in Portogallo nel 2013 (De Wit et al., 2018; Legnardi et al., 2022), suggerendo una circolazione protratta nel tempo e probabilmente sottodiagnosticata. Ciò non fa che avvalorare l'utilità dei sistemi di classificazione filogenetici proposti tra l'esecuzione degli studi sopraccitati e il presente lavoro, i quali hanno permesso una caratterizzazione più completa e standardizzata dei ceppi identificati. D'altra parte, le analisi virologiche e sierologiche appaiono ancora necessarie per una piena comprensione della patobiologia di IBDV, e quindi del suo reale impatto clinico ed economico.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano una significativa circolazione di ceppi IBDV di campo in Europa occidentale, in particolare di virus riassortanti con una VP2 *very virulent-like* e una VP1 *classical-like*, già segnalati in diversi paesi europei e associati a infezioni subcliniche (Mató et al., 2020). Nel presente studio, questi ceppi sono stati individuati in gran numero e in un areale ancora più esteso, dimostrando come essi rappresentino attualmente la tipologia di ceppi di campo di maggior rilevanza per la regione. In aggiunta, un genotipo di recente caratterizzazione è stato dimostrato circolare localmente in Portogallo, mentre in Italia sono stati identificati ceppi sinora riportati solo in Russia, Kazakistan e Medio Oriente. Questi dati potranno risultare utili per una miglior comprensione dell'epidemiologia e dell'evoluzione di IBDV in Europa, e conseguentemente per una pianificazione informata delle strategie di controllo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AH, Al Saegh HA and FS ALaraji. (2021). Sequence diversity and evolution of infectious bursal disease virus in Iraq. *F1000Research*, 16: 293.
2. Alkie TN and S Rautenschlein. (2016). Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*, 19: 9-18.
3. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA and VN Vakharia. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 75: 11974–11982.
4. Chen G, He X, Yang L and P Wei. (2018). Antigenicity characterization of four representative natural reassortment IB DVs isolated from commercial three-yellow chickens from Southern China reveals different subtypes co-prevalent in the field. *Vet. Microbiol.* 219: 183-189.
5. De Wit JJ, Cazaban C, Dijkman R, Ramon G and Y Gardin. (2018). Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. *Avian Pathol.* 47:140-151.
6. Darriba D, Taboada GL, Doallo R and D Posada. (2012). Jmodeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Met.* 9: 772.
7. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. (2004). *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797.
8. Escaffre O, Le Nouen C, Amelot M, Ambroggio X, Ogden KM, Guionie O, Toquin D, Müller H, Islam MR and N Eterradosi. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, 87: 2767–2780.
9. Eterradosi N and YM Saif. (2020). Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, Wiley-Blackwell, pp. 257-283.
10. Gambi L, Berto G, Fiorentini L, Koutoulis K, Barbieri I, Massi P and G Tosi. (2020). Studio della circolazione del virus della bursite infettiva negli allevamenti di pollastre della linea ovaioia da consumo nel periodo maggio-settembre 2019. In *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2020. LIX Convegno Annuale & V Simposio Scientifico* (p. 119). Bologna, Italia.
11. He X, Chen G, Yang L, Xuan J, Long H and P Wei. (2016). Role of naturally

- occurring genome segment reassortment in the pathogenicity of IBDV field isolates in Three-Yellow chickens. *Avian Pathol.* 45: 178-186.
12. Islam MR, Rahman S, Noor M, Chowdhury EH and H Muller (2011). Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) genome segment B of very virulent and classical lineage by RT-PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Arch. Virol.* 157: 333-336.
  13. Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Etteradossi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathol.* 50: 190-206.
  14. Jackwood DJ and SE Sommer-Wagner. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease birnavirus (IBDV). *Virol.* 409: 33–37.
  15. Jackwood DJ, Schat KA, Michel LO and JJ de Wit. (2018). A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathol.* 47: 576-584.
  16. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA x: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.
  17. Legnardi M, Tonellato FR, Cioffi A, Tucciarone CM, Franzo G, Garavini G, Trevisani G, Dall’Angelo A and M Cecchinato. (2021). Caratterizzazione molecolare di ceppi riassortanti del virus della bursite infettiva (IBDV) circolanti in Italia. In *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2021. LX Convegno Annuale & VI Simposio Scientifico* (p. 101). Bologna, Italia.
  18. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K, Duarte I, Silva M, Le Tallec B and M Cecchinato. (2022). Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. *Avian Pathol.* 51: 97-105.
  19. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M and E Catelli. (2016). A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.* 45: 458-464.
  20. Maraver A, Ona A, Abaitua F, Gonzalez D, Clemente R, Ruiz-Diaz JA, Castan JR, Pazos F and JF Rodriguez. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* 77: 6438–6449.
  21. Mató T, Tatár-Kis T, Felföldi B, Jansson DS, Homonnay Z, Bányai K and V Palya. (2020). Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Vet. Microbiol.* 245: 108663.
  22. Michel LO and DJ Jackwood. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch. Virol.* 162: 3661-3670.
  23. Michel LO, Kimber ML and DJ Jackwood. (2019). New introduction of a very virulent infectious bursal disease virus in New York, USA. *Avian Pathol.* 48: 486-491.
  24. Muniz EC, Verdi R, Jackwood DJ, Kuchpel D, Resende MS, Mattos JCQ and K Cookson. (2018). Molecular epidemiologic survey of infectious bursal disease viruses in broiler farms raised under different vaccination programs. *J.*

- Appl. Poult. Res.* 27: 253-261.
25. Rudd MF, Heine HG, Sapats SI, Parede L and J Ignjatovic. (2002). Characterisation of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 147: 1303-1322.
  26. Van Borm S, Steensels M, Mathijs E, Vandenbussche F, van den Berg T and B Lambrecht. (2021). Metagenomic sequencing determines complete infectious bronchitis virus (avian Gammacoronavirus) vaccine strain genomes and associated viromes in chicken clinical samples. *Virus Genes* 57: 529-540.
  27. Wang Y, Fan L, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Wang X and X Qi. (2021). An improved scheme for infectious bursal disease virus genotype classification based on both genome-segments A and B. *J. Integr. Agric.* 20: 1372-1381.