

# **ANALISI MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE NEGLI ANNI 2013 E 2014 . CONSIDERAZIONI SUI GENOTIPI CIRCOLANTI IN ITALIA E IN ALTRI PAESI EUROPEI ED EXTRA-EUROPEI.**

Massi P.<sup>1</sup>, Barbieri I.<sup>2</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Parigi M.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia Romagna- Sezione di Forlì, via Marchini n.1 Forlì (FC)- forli @izsler.it*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna- Brescia*

## **Summary**

Infectious bronchitis virus (IBV) is a coronavirus that causes upper respiratory, renal and/or reproductive diseases with high morbidity in poultry. Classification of IBV is important for implementation of vaccination strategies to control the disease in commercial poultry. Currently, the sequence analysis of the IBV S1 gene is considered the gold standard for IBV strain identification, with a high nucleotide identity ( e.g.  $\geq 95\%$ ) indicating related strains.

A study was carried out on 545 Infectious Bronchitis virus identified in Italy and European Countries and extra European Countries between 2013 and 2014. A portion of the S1 gene was amplified and sequenced in order to explore the genetic variability of the IBV strains circulating in the late two years. Genotypes QX-like, 793B, Q1 and M41 are prevalent in Italy.

Genotypes EG/CLEVB-2, 793B, QX-like and Q1 are prevalent in European and extra European Countries.

## **INTRODUZIONE**

Il virus della Bronchite Infettiva Aviaria (IBV) è un coronavirus, prototipo della famiglia Coronaviridae, pleomorfo, di 80-200 nm di diametro, con genoma RNA a singolo filamento e provvisto d'envelope. E' causa della bronchite infettiva aviaria, malattia altamente contagiosa, caratterizzata da sintomi e lesioni respiratorie, che in alcuni casi può interessare anche gli apparati gastrointestinale ed uro-genitale causando nefropatie con alta mortalità e/o problemi alla deposizione e alla qualità del guscio dell'uovo nelle galline ovaiole. Nel tracciare un quadro epidemiologico della Bronchite Infettiva si può notare come il coronavirus, responsabile della malattia, sia in continua evoluzione, si assiste infatti alla costante comparsa di nuove varianti con caratteristiche peculiari per virulenza, tropismo o patogenesi. Nel corso degli anni sono state innumerevoli le varianti isolate in campo, differenti fra loro dal punto di vista sierologico, genotipico e patogenetico. Alcuni sierotipi, come i ceppi Massachussets (Mass) ed il 793/B sono stati identificati in molti paesi, ma la maggioranza dei sierotipi sono endemici di ristrette regioni geografiche. Negli ultimi 20 anni nuovi sierotipi di IBV sono stati identificati negli Stati Uniti, in Europa, Cina, Taiwan, Giappone, Colombia, India ed altri paesi. Il sierotipo Massachussets della BI è stato isolato

per la prima volta in Europa negli anni '40 (Cavanagh & Davis, 1993) mentre Petek, Paparella & Catelani, e Galassi descrissero contemporaneamente la BI per la prima volta in Italia nel 1956. L'andamento della malattia nel nostro paese, riguardo la prevalenza e la gravità, è stato fluttuante negli anni. Alla virosi primaria respiratoria inizialmente osservata, a partire dagli anni '60 si aggiunse la sindrome "nefrite/nefrosi" dovuta a ceppi nefropatogeni (Pascucci et al., 1990). A questo periodo risale infatti la prima segnalazione di un nuovo sierotipo in Italia: il ceppo nefropatogeno 1731PV (Rinaldi et al., 1966). Durante gli anni '70 la BI si è andata gradualmente attenuando, Zanella segnalava in quegli anni la notevole diffusione del ceppo nefropatogeno AZ23/74 (Zanella, 1976). All'inizio degli anni '80 si assiste invece ad una sensibile ripresa della malattia e durante tutto il decennio si sono moltiplicati gli isolamenti di ceppi differenti, tra i quali il 3794/Fo/83 (Pascucci et al., 1986a) associato a gravi forme respiratorie, ed utilizzato anche nei prodotti vaccinali. Negli anni '80 sono state isolate con una certa frequenza le varianti tipizzate in Olanda: il ceppo D207 (anche conosciuto come D274) ed il D212 (meglio conosciuto come D1466). In particolare, il sierotipo D274 risultava essere anche il più diffuso in alcuni paesi dell'Europa occidentale all'inizio e alla metà degli anni '80 (Cook, 1984; Develaar et al., 1984). Il genotipo 793/B fu identificato per la prima volta in Inghilterra nel 1990/91 (Gough et al., 1992; Parsons et al., 1992), ma la sua presenza è stata retrospettivamente dimostrata in Francia a partire dal 1985 (Cavanagh et al., 1998), mentre nei primi anni '90 fu isolato anche in Messico e Thailandia (Cook et al., 1996). Il sierotipo 624/I fu inizialmente descritto nel 1993 associato a forma respiratoria nel broiler (Capua et al., 1994), la successiva caratterizzazione molecolare ha confermato che si trattava di un nuovo genotipo (Capua et al., 1999). Il genotipo QX per la prima volta descritto in Cina nel 1995, è stato segnalato in Europa a partire dal 2002 ed in Italia a partire dal 2005 associato a gravi forme di nefrite e nefrosi in pollastre e broilers. Negli anni 2004-2005 Landman e collaboratori hanno descritto per la prima volta il fenomeno delle "false ovaiole" in riproduttori e ovaiole da consumo di diverse linee genetiche. Tale fenomeno è stato messo in correlazione ad una pregressa infezione con forma nefropatogena da IBV con genotipo sovrapponibile al QX cinese, verificatasi nelle prime due settimane di vita degli animali. Nel 2011 (Toffan et al.) è stata segnalata la presenza del genotipo Q1 sul nostro territorio nazionale e per la prima volta in Europa. Il virus è stato isolato da un allevamento di broiler affetti da scarso accrescimento. Infine nel 2013 (Massi) è stata segnalata la presenza del genotipo CK/CH/Guangdong/Xindadi in galline ovaiole del Nord Italia. La circolazione dello stesso genotipo è stata confermata nel 2014 da Moreno et al. Le problematiche legate al controllo della bronchite infettiva, dovute principalmente alla notevole variabilità antigenica dell'IBV ed alla bassa cross-protezione tra sierotipi differenti, rendono necessario il costante monitoraggio dei ceppi circolanti sul territorio nazionale in modo da poter improntare misure efficaci di profilassi. Conseguentemente, l'isolamento e la tipizzazione dei ceppi di IBV risultano di fondamentale importanza non solo per lo studio

dell'evoluzione virale ma anche per l'adattamento dei programmi vaccinali ai ceppi effettivamente circolanti.

Questo lavoro si prefigge di ottenere una visione globale della complessa situazione epidemiologica dell'IBV sul territorio nazionale e in Paesi limitrofi. A questo scopo sono stati caratterizzati mediante metodi molecolari i ceppi di IBV provenienti da differenti Regioni geografiche e tipologie di allevamento, allo scopo di monitorare i ceppi attualmente circolanti ed evidenziare eventuali genotipi nuovi e/o emergenti in Italia e Paesi limitrofi.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Lo studio si riferisce a campioni conferiti presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I campioni erano primariamente di origine italiana e secondariamente provenivano da Paesi europei (Francia, Germania, Romania) ed extraeuropei (Giordania, Libano, Marocco, Federazione Russa, Arabia Saudita, Camerun, Algeria, Egitto, Albania, Ucraina, Tunisia, Bielorussia, Sud-Saharian Countries, Emirati Arabi Riuniti).

I campioni conferiti comprendevano animali vivi con segni clinici respiratori o con problemi di ovodeposizione, animali deceduti, visceri, tamponi tracheali.

In particolare, sono stati inclusi nell'analisi:

- tamponi tracheali conferiti presso la sezione con richiesta di ricerca di IBV
- campioni di organo (trachea, rene, tonsille cecali, ovaio, ovidutto) prelevati in sede autoptica da soggetti in cui vi fosse sospetto di bronchite infettiva
- campioni di organi di animali sottoposti a monitoraggio di controllo per sindromi respiratorie senza specifici sospetti diagnostici.
- FTA cards

In fase di accettazione sono state raccolte informazioni sullo stato sanitario del gruppo di animali ed il piano vaccinale eventualmente effettuato nell'allevamento di provenienza.

### *Caratterizzazione molecolare di IBV*

La ricerca del virus IBV è stata condotta mediante RT-PCR. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit di estrazione RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. L'RNA così estratto è stato sottoposto a reazione di RT-PCR:

- Reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-; tabella 2), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (Cavanagh et al., 1999) del virus. In particolare, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®), in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 600nM di ogni primer 5µl di 5X Onestep RT-PCR Buffer, 0.4nM di ogni dNTP, 12.5U di inibitori delle Rnasi, 1µl di OneStep RT-PCR enzyme mix e 5µl di estratto di RNA. Profilo di amplificazione: 1 X (50°C, 30 min), 1 X (94°C, 15 min), 40 X (94°C, 30 sec; 55°C, 30sec, 72°C, 40 sec), 1 X (72°C, 10 min)

### *Sequenziamento ed analisi della variabilità genetica*

Le reazioni di sequenza sono state approntate a partire dal prodotto PCR, previa purificazione su gel (Qiaquick Gel extraction kit – QIAGEN®) con il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem®) secondo le istruzioni del produttore. Le sequenze sono state effettuate in entrambe le direzioni impiegando gli stessi primers utilizzati nell'amplificazione. Le reazioni di sequenza sono state sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga3500xl (Applied Biosystems®). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v10.0 (DNASTAR Inc., Madison®, WI, USA).

L'analisi della variabilità genetica è stata effettuata comparando la sequenza dei ceppi in esame con le sequenze di genotipi di riferimento e di ceppi varianti circolanti attualmente: 624/I (JQ901492), 3794/83 FO; AZ23/74;; D274 (X15832); 793B (AF093794); H120 (M21970); M41 (AY561712); PA/1220/ (AY789942); Q1 (AF286302); QX (AF193423); CK/CH/Guangdong/Xindadi (AN: GU938442.1) utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011)

## **RISULTATI**

### **ANNI 2013/2014**

Nel corso degli ultimi due anni sono stati analizzati 1.136 campioni per la ricerca di IBV; di questi 545 (47,9%) sono risultati positivi e sottoposti a sequenziamento.

Nella tabella 1 sono riassunte le identificazioni molecolari effettuate, suddivise per genotipo e per numero. Sono stati identificati 8 differenti genotipi circolanti sul territorio nazionale (793B, QX, Q1, Massachusetts, D274, B1648, 1466 e CK/CH/Guangdong//Xindadi) e 10 differenti genotipi nei Paesi esteri limitrofi. ( 793B, QX, Q1, Massachusetts, CK/CH/Guangdong/Xindadi, 1494, EG/CLEVB-2, SUL/01/09, VARIANT2ISRAEL01 E NGA/293/2006). Dall'analisi di sequenza sono risultati 162 ceppi allineati a ceppi vaccinali.

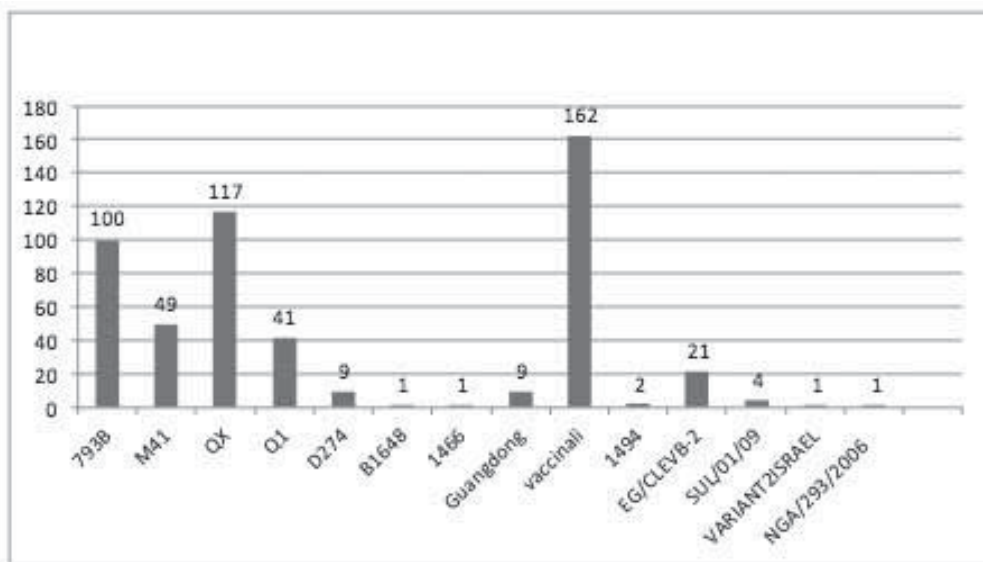
Nonostante il tentativo di raccogliere tutte informazioni reperibili riguardo lo stato vaccinale degli animali analizzati, in molti casi i dati ottenuti non sono risultati completi. A questo proposito, siccome il metodo molecolare utilizzato non è sempre in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo, i dati sono stati rielaborati escludendo dall'analisi tutti i ceppi che mostravano una identità di sequenza del 100% con i ceppi vaccinali più utilizzati (4/91, IB88, H120, 1/96, D274). Bisogna però ricordare che le percentuali di identificazione così rielaborate possono essere considerate solamente una stima, in quanto il ceppo vaccinale ed il ceppo di campo 793B non differiscono affatto nella regione sequenziata.

Da tale rielaborazione sono stati identificati 162 ceppi vaccinali.

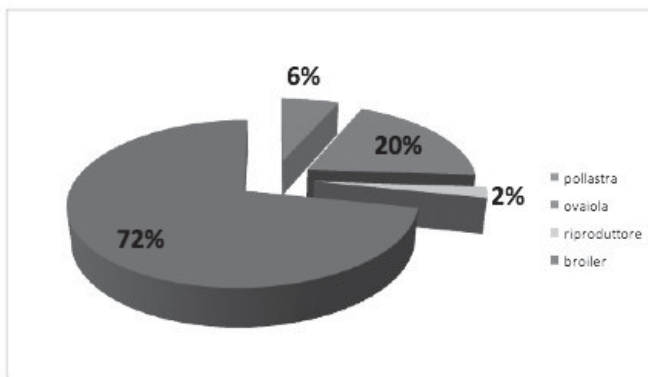
**Tabella 1.** Identificazione molecolare dei ceppi di IBV inclusi nell'analisi.

GENOTIPI	N°ISOLATI
793B	100
M41	49
QX-like	117
Q1	41
D274	9
B1648	1
1466	1
CK/CH/Guangdong/Xindadi	8
1494	2
EG/CLEVB-2	21
SUL/01/09	4
VIARANT2ISRAEL01	1
NGA/293/2006	1
Ceppi vaccinali	162

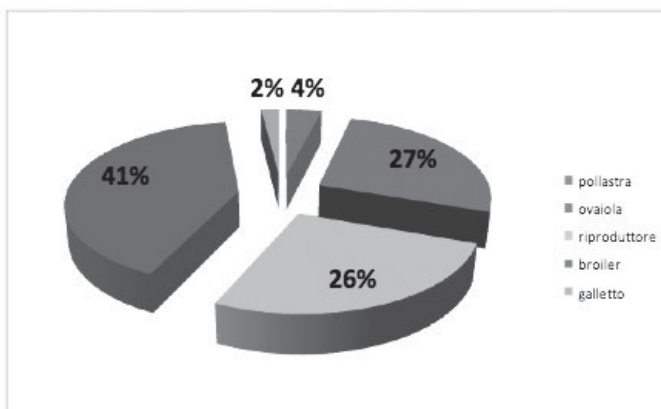
**Grafico n.1:** Analisi della variabilità genetica. Distribuzione dei genotipi di IBV rilevati mediante il sequenziamento di 545 ceppi.



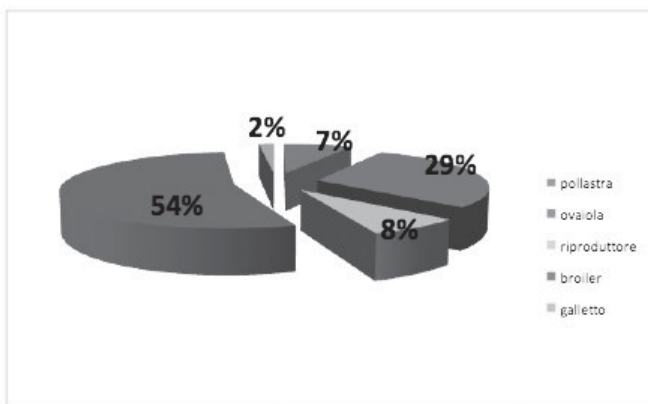
**Grafico n.2 Distribuzione del ceppo M41 nelle diverse specie produttive**



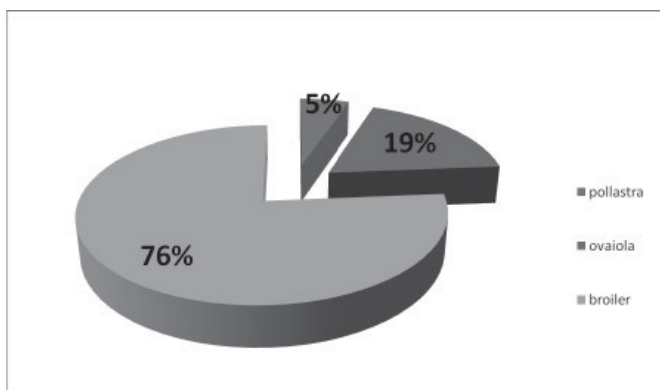
**Grafico n.3: Distribuzione del ceppo 793B nelle diverse specie produttive**



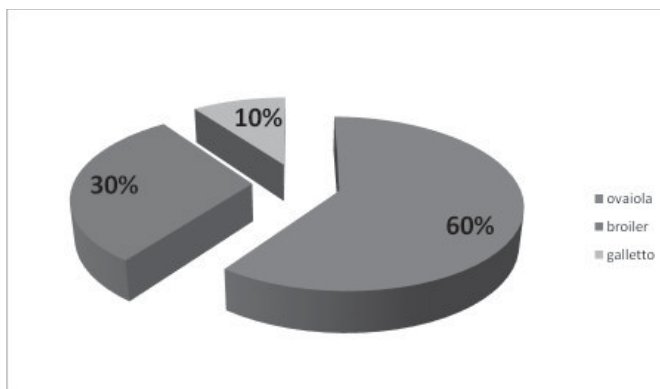
**Grafico n.4: Distribuzione del ceppo QX nelle diverse specie produttive**



**Grafico n.5: Distribuzione del ceppo Q1 nelle diverse specie produttive**



**Grafico n.6: Distribuzione del ceppo Ck/CH/Guangdong/Xindadi nelle diverse specie produttive**



## **DISCUSSIONE**

I dati raccolti in questo lavoro riguardano i ceppi di IBV isolati negli anni 2013 e 2014 da campioni provenienti dal territorio nazionale e Paesi esteri. In particolare, i ceppi isolati provengono da 14 diverse Regioni italiane. In realtà, la maggioranza dei ceppi analizzati provengono dalle Regioni settentrionali (59%). Considerando però che oltre il 70% della produzione di carni avicole e di uova è concentrata in tre regioni del Nord Italia (Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna) è possibile considerare questa indagine come rappresentativa della situazione nazionale nel suo complesso.

La caratterizzazione molecolare ha permesso di rilevare 8 genotipi differenti circolanti sul territorio nazionale con percentuali variabili: 30,6% per il genotipo 793B, 35,8% per il genotipo QX-like, 15% per il genotipo Massachusetts, 12,5% per il genotipo Q1, 2,7% per il genotipo D274, 0,3% per il genotipo B1648, 0,3% per

il genotipo 1466 ed il 2,5% per il genotipo CH/CK/Guangdong/Xindadii. In accordo con quanto riportato precedentemente (Moreno et al., 2007; Tosi et al., 2010; Taddei et al., 2011), il genotipo 793B resta un genotipo ad alta diffusione. Bisogna però considerare che il metodo di analisi utilizzato non è in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo e conseguentemente, la percentuale riportata potrebbe essere una sovrastima dovuta all'inclusione nell'analisi di ceppi vaccinali attenuati vivi, largamente utilizzati nell'allevamento avicolo.

Il genotipo QX, segnalato in Europa a partire dal 2002 (Bochkov et al., 2006) e in Italia a partire dal 2005 (Beato et al., 2005), risulta essere, il genotipo a maggiore diffusione, mentre il genotipo Massachusetts, molto diffuso in tutta Europa (Worthington et al., 2008) è stato identificato nel 12,5% degli isolati analizzati, presentando una circolazione costante negli ultimi anni.

Il genotipo It02, isolato per la prima volta in Italia nel 1999 (Bochkov et al., 2007), nel corso dell'ultimo decennio era arrivato a notevole diffusione (30.5% tra il 2005 ed il 2007) (Moreno et al., 2007), non è stato rilevato nel corso degli ultimi due anni confermando una netta diminuzione della circolazione di questo genotipo già negli anni precedenti.

Il genotipo 624/I, diffuso in Italia tra gli anni '60 e '90, aveva drasticamente diminuito la sua diffusione fino all'ultima registrazione risalente al 2004 (Moreno et al., 2007) per ricomparire nel 2010, 2011 e 2012. Dall'indagine degli ultimi due anni tale genotipo non è stato riscontrato. Nel nostro lavoro, la diffusione del genotipo Q1, identificato per la prima volta in Italia nord-orientale nel 2011 appare in netto aumento di diffusione. Sulla base dei dati raccolti il genotipo risulta essere attualmente diffuso nell'intero territorio nazionale essendo stato isolato anche in regioni centro-meridionali (Calabria, Lazio e Marche). Il genotipo Q1, descritto per la prima volta nel 2001 in Cina, isolato da ovaiole con lesioni da proventriculite (Yu et al., 2001) mostra una notevole identità di sequenza nel gene S1 con il genotipo 624/I e con la variante 3794/1983 conosciuta come ceppo "Fornino" ed ampiamente utilizzata durante gli anni '80 nei prodotti vaccinali.

Il genotipo D274, molto diffuso negli anni '80 e all'inizio degli anni '90 in molti paesi dell'Europa occidentale e nei Paesi Bassi, era stato isolato in Italia in maniera episodica tra il 2009 ed il 2010 (0.5%), ed il suo rilevamento sporadico è confermato nel corso del 2013 e 2014.. Sono comparsi in maniera sporadica anche i genotipi B1648 e 1466.

Infine si assiste ad un incremento percentuale della presenza del genotipo CK/CH/Guangdong/Xindadii (2,5%).

La caratterizzazione genetica dei ceppi pervenuti da Paesi esteri ha permesso di mettere in evidenza la circolazione di 13 genotipi diversi. Fra questi la maggior prevalenza è data dai genotipi: EG/CLEVB-2 con il 25,9% , 793B con il 24,6%, QX-like con il 15,5%, Q1 con il 14,2% e a seguire tutti gli altri genotipi con prevalenze comprese fra il 5 e l'1%.

## CONCLUSIONI

Sulla base dei dati raccolti nel corso del 2013-2014 la diffusione dei genotipi di IBV nel territorio nazionale appare diversificata. Sono stati identificati 8 diversi



genotipi circolanti: 793B, QX, Massachusetts, Q1, D274, B1648, 1466 e CK/CH/Guangdong/Xindadii. Il genotipo QX risulta essere quello maggiormente diffuso. Il genotipo 793B si conferma ampiamente diffuso rimanendo il secondo in ordine di diffusione, seguito dai genotipi Massachusetts e Q1. Di quest'ultimo va rilevata una progressiva diffusione nelle diverse specie allevate. I genotipi D274, B1648 e 1466 compaiono invece più sporadicamente.

Nei primi mesi del 2013 si assiste alla comparsa del nuovo genotipo CK/CH/Guangdong/Xindadii che poi, anche se sporadicamente, si è diffuso su scala nazionale.

Per quanto attiene ai genotipi circolanti nei Paesi Esteri si assiste ad una circolazione di una vasta gamma di genotipi, alcuni dei quali ( EG/CLEVB-2, SUL/01/09, VARIANT2 ISRAEL01) non circolanti nel territorio italiano.

Sarà interessante continuare a monitorare la diffusione del virus Bronchite al fine di stabilire se altri genotipi (es.il CK/CH/Guangdong/Xindadi) possano diffondersi con la stessa velocità dei ceppi QX e Q1.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Beato M.S., De Battisti C., Terregino C., Drago A., Capua I., Ortali G., (2005). Evidence of circulation of a chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *The Veterinary Record* 156:720.
2. Bochkov Y.A., Tosi G., Massi P., and Drygin V. (2007). Phylogenetic analysis of partial S1 and N genes sequences of infectious bronchitis viruses isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Vir gen.* 35:65-71.
3. Bochkov Y.A., Batchenko G.V., Scherbakova L.O., Borisov A.V., Drygin V.V., 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathology* 35:379-393.
4. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J., 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 28:593-605.
5. Jackwood M.W., Yousef N.M.H., Hilt D.A., (1997). Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 41:105-110.
6. Massi P. (2013). Situazione epidemiologica della Bronchite Infettiva in Italia. *Atti della Giornata di Studio: "Ritorno al futuro. La Bronchite Infettiva: patologia antica, nuovi patogeni"*. Bologna 2 ottobre 2013. *Atti Congressuali –Rivista di Medicina Veterinaria Speciale* 2013.
7. Moreno A., Fallacara F., Tosi G., and Massi P. (2007). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della bronchite infettiva aviaria isolati in Italia tra il 2005-2007. *Atti II Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria, ISTISAN congressi, Bologna 7-8 Giugno 2007.* –p 55.
8. Moreno A., Ceruti R., Boniotti B., Gavazzi L. Fasoli P., Cordioli P.(2014) Circolazione di un nuovo genotipo di virus della Bronchite Infettiva a viare in Italia. *Atti del Congresso Sipa.Salsomaggiore Terme,8-9 maggio 2014.*pp 177-181.

9. Taddei R., Tosi G., Barbieri I., Fiorenti L., Massi P., Boniotti B. (2011). Caratterizzazione molecolare dei ceppi del virus della bronchite infettiva aviare in Italia: aggiornamento dei dati raccolti nel corso dell'anno 2010. Atti del L Congresso nazionale SIPA. Forlì 7-8 aprile 2011. pp189-196.
10. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
11. Toffan A, Terregino C, Mazzacan E, Castaldello I, Capua I, Bonci M. (2011). Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Vet Rec.*;169(8):212-3.
12. Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Fiorentini L., Massi P. (2010). Caratterizzazione molecolare dei ceppi di virus della Bronchite Infettiva aviare isolati in Italia nel periodo 2007-2009 e nel primo bimestre del 2010. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA) 2010:XLIX Convegno annuale Forlì 29-30 Aprile 2010. pag. 217-224.
13. Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC.(2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol. Jun*;37(3):247-57.