

## STUDIO DELL'EFFETTO FILIERA SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI QX IN ITALIA

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>2</sup>, Trogu T.<sup>3</sup>, Moreno A.<sup>3</sup>, Ceruti R.<sup>4</sup>, Pesente P.<sup>5</sup>, Ortali G.<sup>5</sup>, Gavazzi L.<sup>4</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università di Padova, Legnaro (PD), Italia.*

<sup>2</sup> *Sezione di Forlì, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna, Forlì Cesena (FC), Italia.*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Virologia, Sezione di Brescia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna, Brescia (BS), Italia.*

<sup>4</sup> *Gesco sca, Cazzago San Martino (BS), Italia.*

<sup>5</sup> *Laboratorio Tre Valli, San Michele Extra (VR), Italia.*

### Summary

Infectious bronchitis is one of the main health problems in poultry and its epidemiology can be quite heterogeneous. In Italy, QX genotype (lineage GI-19) is considered the major field strain and different control strategies have been implemented to limit its impact, further shaping IB variability. The present study aimed to compare the epidemiology of QX in two different Italian integrated supply chain, namely A and B, as particular/separate determinants, using phylogenetic and phylodynamic approaches on the S1 hypervariable region of QX sequences collected between 2012 and 2016. The two integrated productive systems appeared to be quite distinct, except for some strains which seem to have spread from A to B, potentially by intermediate passages in a third chain, which was estimated by the models to justify the acquired variability but can be plausible considering the Italian production and overlapping distribution of the farms. The population dynamics of QX in the two chains reflected an overall increasing trend, even though less sudden and more restrained in the supply chain A. This study shows the importance of the epidemiological monitoring and suggest once more how differences in management and control strategies can affect IBV variability.

### INTRODUZIONE

La Bronchite infettiva (IB) è una patologia endemica ed estremamente diffusa nell'allevamento avicolo, specialmente se intensivo. Negli allevamenti positivi, anche se gestiti in maniera ottimale, è stata stimata una perdita di produttività del 3% rispetto ad allevamenti negativi (McMartin, 1993). Le caratteristiche del virus della bronchite infettiva (IBV) si riflettono nelle varie problematiche di questo patogeno come l'elevata morbilità, la grande efficienza di trasmissione, l'ampia variabilità genetica, le difficoltà diagnostiche, la scarsa cross-protezione tra i diversi ceppi e la conseguente difficoltà nell'individuare dei vaccini efficaci (Jordan, 2017). Di conseguenza, anche l'epidemiologia della Bronchite infettiva risulta inevitabilmente intricata, influenzata da numerosi fattori e condiziona a sua volta la scelta delle strategie di controllo e la loro efficacia.

La circolazione di IBV sul territorio italiano è stata ampiamente descritta, in risposta alla necessità di contenere il problema in una delle maggiori realtà produttive euro-

pee (6° paese per produzione di carne, 3° di uova) (<https://ec.europa.eu/agriculture/>), riportando uno scenario caratterizzato dall'identificazione di ceppi vaccinali Mass-like e 793B-like (Franzo et al., 2014) e di ceppi di campo Q1 (Franzo et al., 2018) e QX (Franzo et al., 2017), tra i più rilevanti, con differenti prevalenze nel tempo. L'importanza della conoscenza dell'epidemiologia locale è stata più volte messa in luce, in relazione all'interpretazione sia dell'effettivo ruolo di alcuni ceppi, come nel caso del 793B la cui frequenza si è drasticamente ridotta a seguito della sospensione dell'utilizzo di vaccini *793B-derived* (Franzo et al., 2014), sia dell'influenza della vaccinazione sulla dimensione della popolazione virale e degli *outbreak* clinici, come evidenziato per il QX (Franzo et al., 2016).

In questo contesto si inserisce il presente lavoro che ha avuto come obiettivo l'analisi di ulteriori elementi che possono condizionare l'epidemiologia di IBV, descrivendo per la prima volta l'effetto filiera sulla variabilità e la circolazione di ceppi QX, confrontando la popolazione e i flussi virali di due situazioni produttive separate.

## MATERIALI E METODI

Per lo studio sono stati raccolti dei campioni provenienti da allevamenti avicoli di broiler e ovaiole in Italia, appartenenti a due filiere distinte. Per ciascun campione sono state registrate le informazioni inerenti alla filiera di appartenenza, la localizzazione dell'allevamento, la categoria produttiva e la data di campionamento. Dopo estrazione dell'RNA tramite kit commerciale NucleoSpin® 8/96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany), i campioni sono stati preliminarmente testati con una real-time RT-PCR commerciale per l'identificazione di IBV (Quantification of Avian Infectious Bronchitis Virus-IBV-kit; Genesig, Southampton, UK). I campioni positivi sono stati amplificati nella regione ipervariabile HVR3 con i primer XCE1-XCE2 (Cavanagh et al., 1999) e sequenziati con metodo Sanger con gli stessi *primer* utilizzati per la genotipizzazione, confrontandoli con le sequenze di riferimento pubblicate da Valastro et al. (2016) mediante analisi filogenetica. Per le analisi bioinformatiche sono stati selezionati solo i ceppi appartenenti al *lineage* GI-19, ovvero genotipo QX, e tutti i ceppi con 100% di identità con i ceppi vaccinali sono stati rimossi dal database. Al fine di ricostruire il passaggio di ceppi da una filiera all'altra e di stimare l'intensità di tali flussi, è stato utilizzato un metodo basato sulla *structured coalescent*, implementato in BEAST2. In estrema sintesi, questo approccio permette di suddividere la popolazione virale in una serie di *demi* o isole, ciascuno caratterizzato da una propria dimensione e connesso agli altri da un certo tasso di migrazione. L'utilizzo di sequenze di cui sia nota la data di campionamento e la ricostruzione delle relazioni filogenetiche fra queste, rende inoltre possibile la contestuale stima di diversi parametri inerenti alla genetica, all'origine temporale degli antenati (*time to most recent common ancestor*, tMRCA), all'evoluzione e alla storia demografica della popolazione virale considerata.

Nel presente studio, le sequenze di IBV ottenute sono state utilizzate per stimare, oltre ai tassi evolutivi, i tMRCA e le dinamiche di popolazione, la storia della migrazione dei virus fra le due filiere nel corso del tempo e i relativi tassi di migrazione. Consapevoli del fatto che altre filiere operino sul territorio italiano, è stata eseguita un'ulteriore analisi che includesse una filiera "fittizia", ossia un *deme* di cui si assumeva l'esistenza pur in assenza di sequenze disponibili. In questo modo è stato possibile includere nel modello di migrazione un ulteriore "attore", e valutarne l'eventuale ruolo di mediazione nell'introduzione di ceppi da una filiera all'altra, o fra allevamenti della stessa filiera.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati inclusi nello studio un totale di 377 ceppi QX, di cui 16 di origine vaccinale, provenienti da allevamenti distribuiti in Italia, appartenenti a due filiere (A e B) e raccolti nel periodo 2012-2016. Le restanti 361 sequenze sono state classificate come QX di campo: 135 sequenze provenivano dalla filiera A, mentre 226 dalla filiera B.

L'origine di IBV in Italia viene ricondotta ai primi anni del nuovo millennio, a seguito dell'introduzione dall'estero, probabilmente avvenuta nella filiera A (approssimativamente nel 2004 [2000-2010]), mentre la prima introduzione nella filiera B sembra essere avvenuta all'incirca nel 2009 [2007-2011]. L'analisi filodinamica ha permesso di stimare le dinamiche della popolazione nel corso del tempo nelle rispettive filiere. Sebbene questi metodi permettano di fare stime anche per periodi antecedenti ai primi campionamenti, queste finestre temporali si caratterizzano solitamente per una maggiore incertezza, specialmente nel caso di parametri complessi come la storia demografica. Per tale motivo vengono qui riportati i risultati a partire dal limite superiore del 95 *High Posterior Density* (HPD) della stima del tMRCA di ciascuna filiera.

Il confronto della dinamica di popolazione del genotipo QX nelle due filiere (Figura 1), mostra un andamento relativamente stabile nel caso della filiera A, caratterizzato da una lieve diminuzione nel periodo 2012-2015 rispetto al livello iniziale, cui è seguito un aumento della circolazione virale nella successiva fase e perdurato fino alla fine dello studio. Va tuttavia sottolineato che le oscillazioni menzionate nel valore medio della popolazione virale sono di lieve entità e in massima parte comprese all'interno dell'intervallo di confidenza degli altri momenti temporali considerati, evidenza che depone a favore di una popolazione virale sostanzialmente costante nel corso del tempo. La popolazione virale della filiera B si caratterizza invece per un andamento decisamente più altalenante. Sebbene la popolazione rimanga costante fino alla fine del 2013, una leggera riduzione precede invece una vistosa espansione fino all'inizio del 2015, a cui segue una progressiva riduzione fino al termine del periodo analizzato nello studio. È interessante notare come tale picco nella popolazione di IBV rifletta una variazione nella strategia vaccinale, originando alcuni mesi dopo l'interruzione della somministrazione di una vaccinazione Mass+793B, a favore del solo Mass. Similmente il rapido declino osservato a partire dal 2015 segue all'introduzione di un vaccino omologo nel programma vaccinale.

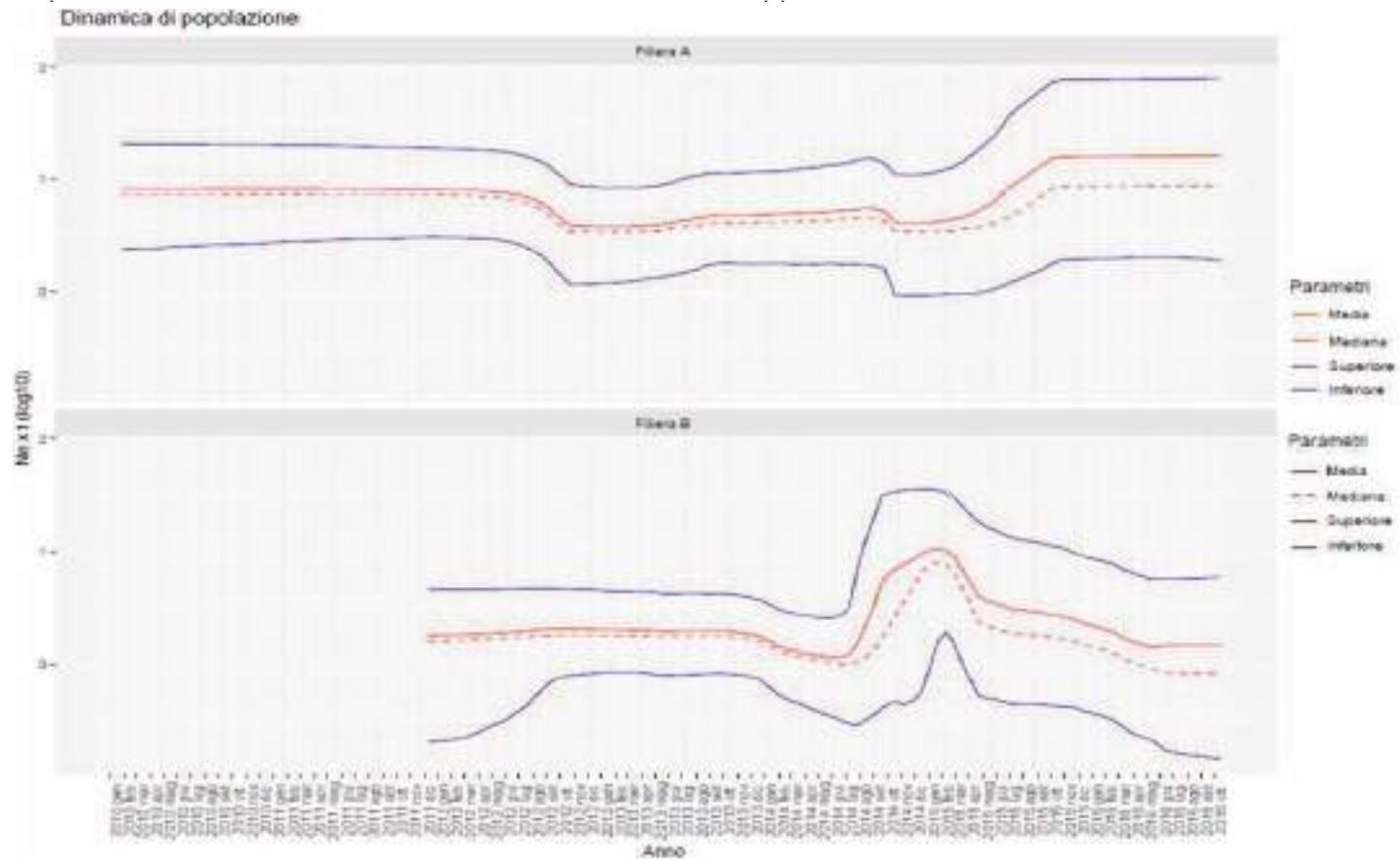
Nonostante le differenze osservate fra le 2 filiere, un certo parallelismo nei trend delle filiere A e B è comunque osservabile, essendo riscontrabile una tendenza all'aumento della circolazione virale a partire dagli ultimi mesi del 2014. Tale evidenza potrebbe quindi riflettere una generale maggiore pressione infettante sul territorio italiano, che potrebbe aver avuto esiti differenti in termini di intensità, potenzialmente in funzione di differenze strutturali o manageriali nelle 2 filiere.

La ricostruzione dell'albero filogenetico (Figura 2) mostra come le sequenze delle due filiere *clusterizzano* nettamente in due *clade* separate, con un'elevata variabilità entro filiera che progressivamente si accumula nel tempo. Tuttavia, un limitato numero di sequenze (i.e. 11) ottenute da campioni provenienti dalla filiera B sono classificati nella *clade* della filiera A, ad indicare come solo alcuni ceppi circolanti nella filiera A abbiano raggiunto la filiera B, continuando, in parte, a differenziar-

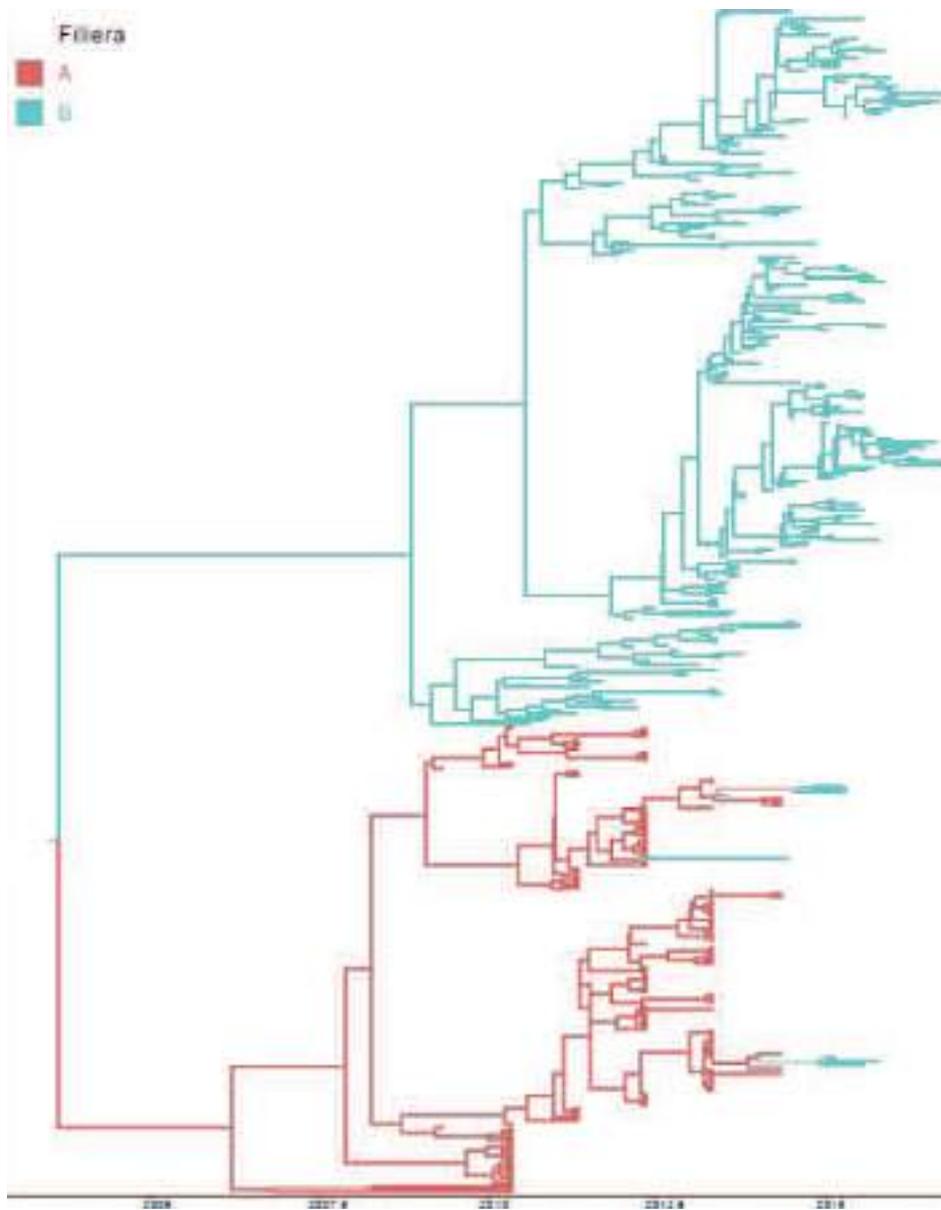
si. Nonostante gli elevati standard di biosicurezza e la netta separazione che caratterizzano i sistemi produttivi integrati italiani, la collocazione geografica degli allevamenti predispone ad una certa promiscuità, che inevitabilmente aumenta il rischio di diffusione e condivisione dei patogeni. In effetti, tutte le sequenze della filiera B che *clusterizzano* nella *clade* della filiera A sono originate da allevamenti localizzati nell'area ad alta densità di allevamento del Nord Italia.

Tuttavia, un'analisi limitata a due sole filiere, per quanto grandi, potrebbe non rispecchiare adeguatamente il reale scenario epidemiologico italiano. Un secondo albero (Figura 3) è stato quindi ricostruito tenendo in considerazione la presenza di un'ipotetica terza filiera, permettendo di collocare in uno scenario epidemiologico esterno parte dell'evoluzione dei ceppi circolanti. In effetti, l'introduzione nel modello di una filiera "fittizia", in grado di giustificare parte della variabilità osservata e di introdurre una potenziale terza tappa negli scambi e nei passaggi del virus, ha comportato un significativo cambiamento nello scenario stimato, in particolare per quanto concerne la filiera B. In effetti, molti degli eventi di introduzione di nuovi ceppi all'interno di questa filiera sembrerebbero riconducibili alla mediazione di altre filiere o allevamenti. Poiché nessuna imposizione è stata imposta nel modello circa l'esistenza di tali migrazioni e la loro intensità, la stima di questo pattern è frutto di un'interpretazione probabilistica, e quindi oggettiva, dei dati. Questa ricostruzione propone, come scenario più verosimile per spiegare la variabilità dei ceppi campionati nella filiera B, una loro evoluzione indipendente (almeno per tratti della storia evolutiva) in altri allevamenti, seguita da eventi di introduzione multipla. La robustezza di tali risultati appare confermata dall'assenza di queste dinamiche nella filiera A, dove l'evoluzione dei ceppi sembra essere essenzialmente avvenuta all'interno della stessa, con occasionali *spillover* verso altre filiere.

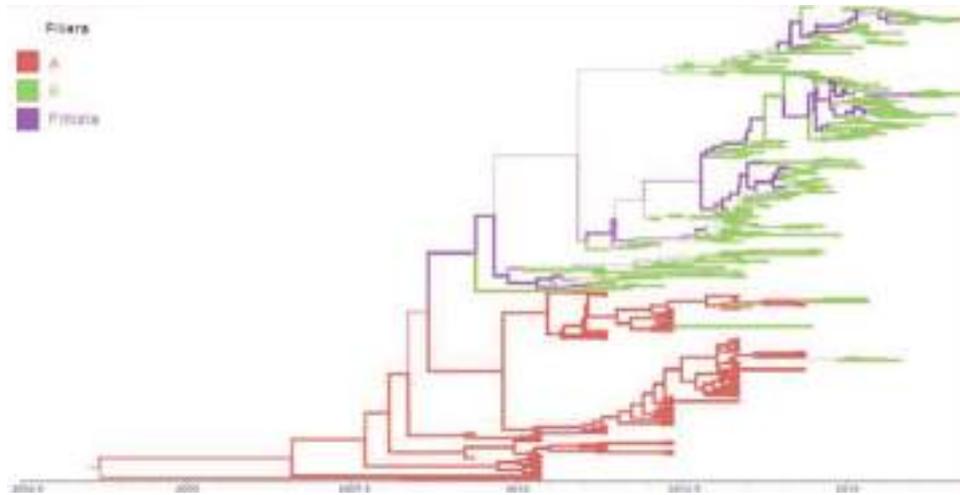
In modo concorde, le stime dei flussi virali (Figura 4) evidenziano come la terza filiera sia coinvolta in uno scambio di ceppi reciproco e relativamente intenso con la filiera B che, a sua volta, sembra ricevere un flusso virale dalla filiera A, la quale invece risulta più isolata e meno permeabile all'ingresso di ceppi provenienti dalle altre filiere. Nonostante il ruolo chiave ipotizzato per la terza filiera, la dimensione stimata della popolazione virale in essa circolante è molto ridotta e appare circa 1/6 della popolazione della filiera A e 1/18 della filiera B. La direzionalità dei flussi risulta quindi inaspettata, ma altri fattori come la localizzazione delle aziende, il management, la condivisione di mezzi di trasporto degli animali o del mangime, potrebbero contribuire alla diffusione del virus tra le filiere. È interessante notare, a supporto dell'attendibilità del modello, come le stime della dimensione dei diversi *demi*, seppur con un ovvio margine d'errore, ben ripropongano la suddivisione delle quote dell'avicoltura nazionale fra le diverse filiere. Ciononostante, il modello a tre filiere, trattandosi di una stima probabilistica, deve sicuramente essere interpretato con cautela. Tuttavia, le analisi effettuate evidenziano come, sebbene con una moderata frequenza, eventi di trasmissione fra filiere possano avvenire, specialmente nelle aree ad alta densità di allevamento come il Nord Italia. Risulta altresì evidente la necessità di una condivisione più ampia possibile dei dati disponibili circa l'epidemiologia molecolare di IBV, al fine di poter creare modelli quanto più attendibili possibili, che permettano un'accurata comprensione del suo comportamento e ne favoriscano il controllo.



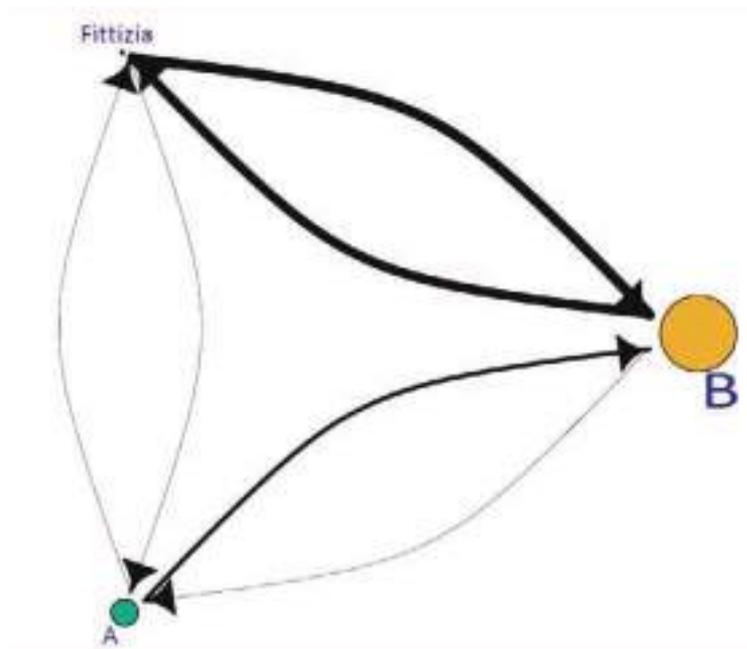
**Figura 1:** *Bayesian skyline plot* delle dinamiche di popolazione dei ceppi QX nelle filiere A (sopra) e B (sotto). Media, mediana e intervallo superiore e inferiore di 95HPD (*Highest Posterior Density*) della diversità genetica relativa (i.e.  $Ne \cdot \tau$ ) sono rappresentati nel tempo.



**Figura 2:** albero filogenetico con due filiere. Le sequenze provenienti dalle filiere A e B sono colorate in rosso e azzurro rispettivamente.



**Figura 3:** albero filogenetico con tre filiere. Le sequenze provenienti dalle filiere A e B sono colorate in rosso e verde rispettivamente, mentre il percorso evolutivo stimato nella filiera fittizia è rappresentato in viola e la probabilità della stima è indicata dallo spessore del ramo.



**Figura 4:** stima dei flussi virali tra le filiere. L'intensità del flusso è indicata dallo spessore della freccia, mentre la dimensione della popolazione virale della filiera è indicata dal diametro del cerchio che la rappresenta.

## CONCLUSIONI

Questo studio mette in luce la circolazione di QX all'interno di due importanti filiere italiane e mostrando come la popolazione virale sia generalmente ben distinta, ad eccezione dell'introduzione di alcuni ceppi derivati dalla filiera A e potenzialmente da altre fonti nella filiera B. Le misure di biosicurezza e le modalità produttive che caratterizzano la filiera come flusso produttivo integrato e autosufficiente sembrano complessivamente garantire un adeguato isolamento e la protezione del proprio ambito epidemiologico, favorendo un'evoluzione relativamente indipendente dei rispettivi gruppi virali nel corso del tempo.

## BIBLIOGRAFICA

1. Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E. and Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine*, 32(50), pp.6765-6767.
2. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Nofrarias, M., Biarnés, M., Cortey, M., Majó, N., Catelli, E. and Cecchinato, M., 2016. Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine*, 34(46), pp.5670-5676.
3. Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C.M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., Ciccozzi, M., Lavazza, A., Cecchinato, M. and Moreno, A., 2017. Think globally, act locally: Phylodynamic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. *PLoS one*, 12(9), p.e0184401.
4. Franzo, G., Cecchinato, M., Tosi, G., Fiorentini, L., Faccin, F., Tucciarone, C.M., Trogu, T., Barbieri, I., Massi, P. and Moreno, A., 2018. GI-16 lineage (624/I or Q1), there and back again: The history of one of the major threats for poultry farming of our era. *PLoS one*, 13(12), p.e0203513.
5. Jordan, B., 2017. Vaccination against infectious bronchitis virus: a continuous challenge. *Veterinary microbiology*, 206, pp.137-143.
6. McMartin, D.A., 1993. Infectious bronchitis. *Virus infections of vertebrates*. JB McFerran and MS McNulty, eds. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, the Netherlands, pp.249-275.