

RICOSTRUZIONE TRAMITE UN APPROCCIO FILODINAMICO DELLA CIRCOLAZIONE DI AVIAN METAPNEUMOVIRUS SOTTOTIPO B IN EUROPA

Franzo G.¹, Legnardi M.¹, Mescolini G.², Tucciarone C.M.¹, Lupini C.², Quaglia G.², Catelli E.², Cecchinato M.¹

¹*Università degli studi di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e salute (MAPS), Viale dell'Università 16. 35020, Legnaro (PD)*

²*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)*

Summary

Avian Metapneumovirus (aMPV) has been recognized as a respiratory pathogen of turkey and chickens for a long time. In recent years, a crescent awareness of the clinical and economic burden of aMPV, especially subtype B, has been rising among European researchers and field veterinarians. Nevertheless, the knowledge of its epidemiology and evolution is still scattered and limited, whereas a cohesive depiction would be of great relevance for the planning of effective control measures. In the present study, the broadest available collection of partial G gene sequences obtained from European aMPV-B strains was analysed using different phylodynamic and biostatistical approaches to reconstruct the viral spreading over time, as well as the role of different hosts in affecting its evolution. The obtained results demonstrate that after its introduction, approximatively in 1985 in France, the infection spread relatively quickly, involving Western and Mediterranean Europe until the end of the 1990s, and then Eastern Europe from the beginning of the new millennium, in parallel with an increase of viral population size. In the following period, a wider mixing among aMPV-B strains could be observed. Interestingly, most of the within-country genetic heterogeneity was ascribable to single or few introduction events, followed by local circulation. This, combined with the high evolutionary rate herein proven, led to the establishment of genetically and phenotypically different clusters among countries. Such variability could have a significant impact on vaccine-induced cross-protection, which should, therefore, be carefully evaluated. On the contrary, while a significant strain exchange was proven among turkeys, guinea fowls and chickens, no evidence of differential selective pressures or specific amino-acid mutations was observed, suggesting that no host adaptation is occurring. Overall, the present study highlights a sporadic but effective aMPV-B migration among countries, followed by local expansion and genetic diversification driven by the intrinsically high viral evolutionary rate. The presence of different amino acid patterns among strains circulating in particular countries could affect the efficacy of natural or vaccine-induced immunity and should be accounted for when planning control measures implementation.

INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviario (aMPV) è un patogeno che colpisce in particolare il pollo e il tacchino, sebbene altre specie possano essere infettate. È associato a

infezioni del tratto respiratorio superiore che possono portare a rilevanti manifestazioni cliniche e conseguenti perdite economiche, in particolar modo in presenza di infezioni secondarie. aMPV è classificato nella famiglia *Pneumoviridae*, genere *Metapneumovirus*, ed è caratterizzato da un genoma a singolo filamento di RNA con polarità positiva della lunghezza di circa 15 Kb, contenente 8 geni: Nucleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrix (M), Fusion (F), Matrix2 (M2), Small hydrophobic (SH), Attachment (G) e Large polymerase (L). I geni L e P codificano per proteine non strutturali, implicate nella replicazione del genoma virale, mentre le restanti codificano per i componenti del capsido, della matrice e dell'*envelope* virale (Cecchinato et al., 2017). Fra queste, la maggior parte degli studi si sono focalizzati sulla proteina G, una proteina dell'*envelope* necessaria per l'adesione virale alla cellula. Sfortunatamente, non sono ad oggi disponibili studi fini inerenti l'interazione di questa proteina con i recettori dell'ospite e con la sua risposta immunitaria. Cionondimeno, essa è considerata il principale target della risposta immunitaria, in funzione del suo ruolo biologico e della localizzazione sulla superficie virale. Studi preliminari hanno suggerito la presenza di epitopi della risposta cellulare e l'evoluzione direzionale di questa proteina dopo l'introduzione della vaccinazione ne lascia presupporre una significativa rilevanza immunologica. La variabilità genetica del gene G ne ha inoltre determinato l'uso per studi epidemiologici e filogenetici, favorendo una certa attività di sequenziamento. Dopo la sua prima identificazione in Sud Africa sul finire degli anni '70, aMPV e le sindromi da esso causate sono state descritte in diversi stati Europei: Regno Unito, Francia, Spagna, Germania, Ungheria e Italia (Cecchinato et al., 2017). Successivamente la sua presenza è stata riportata a livello mondiale. Sulla base della variabilità genetica sono stati identificate 4 sottotipi (A-D) (Juhász and Easton, 1994). Tradizionalmente i sottotipi A e B sono stati considerati la principale minaccia per l'allevamento europeo, tuttavia studi recenti stanno progressivamente evidenziando una sostanziale assenza del sottotipo A, a favore di aMPV-B (Franzo et al., 2017b; Tucciarone et al., 2018; Andreopoulou et al., 2019). Paradossalmente, nonostante la rilevanza di questo sottotipo e la crescente preoccupazione sia nel mondo scientifico che fra i veterinari di campo, le nostre conoscenze sulla reale epidemiologia, pattern di diffusione, dinamiche di popolazione ed evoluzione di aMPV-B sono, ad oggi, scarse. Per cercare di colmare questa lacuna, nel presente studio è stata eseguita una analisi filodinamica su un ampio database di sequenze parziali del gene G ottenute da ceppi europei di aMPV-B.

MATERIALI E METODI

Preparazione del dataset

Tutte le sequenze disponibili del gene G di ceppi Europei di aMPV-B sono state scaricate da Genbank. Le sequenze sono state incluse solo qualora le informazioni riguardanti l'anno e il paese di campionamento fossero disponibili; quando possibile anche la specie ospite è stata annotata. Inoltre, le sequenze dei principali vaccini utilizzati sono state considerate e allineate con le altre utilizzando MAFFT (Standley, 2013). Poiché la presenza di ceppi ricombinanti o di origine vaccinale può alterare la ricostruzione degli alberi filogenetici, la stima dei parametri di popolazione e oscurare il segnale temporale, queste sequenze sono state rimosse dal dataset. In particolare la presenza di fenomeni di ricombinazione è stata indagata

tramite GARD (Pond et al., 2006) mentre potenziali ceppi di origine vaccinale sono stati rimossi sulla base dei seguenti criteri di esclusione:

1. Robusto clustering (bootstrap > 70) con i ceppi vaccinali;
2. Percentuale di identità nucleotidica più alta del 99% rispetto ai vaccini;
3. Studio di posizioni marker precedentemente identificate;
4. “*Expert opinion*”, basata sulla valutazione della congruenza temporale tra la commercializzazione del vaccino e l’anno di campionamento del potenziale ceppo *vaccine-like* ad esso correlato.

La presenza di un adeguato segnale filogenetico e temporale è stata valutata sul database epurato delle succitate sequenze utilizzando rispettivamente il metodo di *likelihood mapping*, implementato in Iq-Tree (Trifinopoulos et al., 2016) e TempEst (Rambaut et al., 2016).

Analisi filodinamica

Le stime degli antenati comuni (*time to Most Recent Common Ancestor*; tMRCA), il tasso di sostituzione nucleotidica e le dinamiche di popolazione sono state ottenute utilizzando il metodo della coalescente seriale tramite l’approccio Bayesiano implementato in BEAST 1.8.4. (Drummond and Rambaut, 2007). La ricostruzione delle dinamiche di popolazione è stata effettuata utilizzando il metodo non parametrico *SkyGrid* (Gill et al., 2013), mentre i pattern di migrazione geografica sono stati stimati utilizzando un modello a tratti discreti (i.e. codificante lo Stato dove il ceppo è stato campionato come una caratteristica categorica del ceppo stesso) come descritto da Lemey et al. (2009) (Lemey et al., 2009). Un approccio del tutto comparabile è stato utilizzato per ricostruire i salti di specie fra i diversi ospiti nel corso del tempo. In entrambi i casi, la significatività statistica delle migrazioni fra Stati o ospiti è stata valutata tramite Bayesian Stochastic Search Variable Selection. Tutti i parametri sono stati stimati congiuntamente tramite una Markov Chain Monte Carlo di 1 miliardo di generazioni. I risultati sono stati accettati valutando l’adeguatezza della convergenza della simulazione e la presenza di un Estimate Sample Size maggiore di 200. Dopo esclusione come *burn-in* del 20% degli alberi e dei valori campionati, è stato ricostruito il Maximum Clade Credibility Tree e i vari parametri della popolazione virale sono stati riassunti in termini di media, mediana e 95% High Posterior Probability (95HPD).

Analisi delle pressioni selettive

L’azione delle pressioni selettive è stata valutata per evidenziare eventuali differenze nella loro intensità fra i ceppi campionati in polli e tacchini, sia a livello globale che indipendentemente per ciascun codone della proteina. La presenza di pressioni episodiche direzionali è stata testata ponendo i ceppi campionati da pollo come punto di arrivo della spinta evolutiva.

RISULTATI

Dataset

Settantuno sequenze delle 202 inizialmente incluse sono state escluse dallo studio in quanto classificate come di origine vaccinale. Conseguentemente, il dataset fi-

nale includeva 131 sequenze della lunghezza di 330 paia di basi, campionate da 9 Stati europei (Francia, Grecia, Italia, Romania, Russia, Spagna, Olanda, Ucraina e Regno Unito) nel periodo 1985-2019. Nonostante la regione genomica considerata fosse relativamente piccola, sia l'intensità del segnale filogenetico che temporale sono risultate adeguate, rendendo possibili le successive analisi.

Analisi filodinamica

Il tMRCA dei ceppi europei di aMPV-B è stato stimato nel 1981.17 (95HPD 1971.93-1985.28) e il tasso evolutivo era $1.21 \cdot 10^{-3}$ (95HPD $7.11 \cdot 10^{-4}$ - $7.11 \cdot 10^{-3}$ sostituzioni per sito per anno). La ricostruzione delle dinamiche di popolazione ha evidenziato, dopo un marcato incremento a seguito dell'introduzione di aMPV in Europa, una sostanziale stabilità fino indicativamente al 2015, quando si è potuto constatare l'inizio di un lento declino (Figura 1). L'analisi filogeografica ha dimostrato la tendenza a formare dei cluster specifici per ogni paese, in cui singoli eventi introduttivi sembrano in grado di spiegare in massima parte la variabilità genetica entro-stato. In particolare, la prima introduzione di aMPV sembra essere avvenuta in Francia nel 1981 (95HPD 1971.93-1985.28), cui è seguita la migrazione in Italia pochi anni dopo, nel 1984 (95HPD 1980.38-1986.98). Questi 2 paesi si sono rivelati la principale fonte di diffusione di aMPV in altri stati Europei, inclusa l'Olanda nel 1987 (95HPD 1984.07-1989.73), il Regno Unito nel 1989 (95HPD 1987.33-1992.25) e la Russia nel 1996 (95HPD 1989.71-2000.9). La Russia è stata successivamente coinvolta nella diffusione virale in Ucraina nel 2007 (95HPD 2003.62-2008.61), in Spagna nel 2005 (95HPD 200.97-2007.51) e nuovamente in Italia nel 2012 (95HPD 2008.97-2014.96). Nei successivi anni l'Italia è stata poi implicata nell'introduzione di stipiti in Spagna nel 2011 (95HPD 2008.38-2011.18), in Grecia nel 2012 (95HPD 2013.23-2012.99) e in Francia nel 2012 (95HPD 2008.97-2014.95). Una potenziale connessione è stata stimata fra Spagna e Romania nel 2015 (95HPD 2012.38-2016.95). Tuttavia, solamente i link epidemiologici da Francia a Italia e Olanda, dall'Italia alla Grecia e Spagna, dalla Spagna alla Romania e dalla Russia all'Ucraina hanno dimostrato un robusto supporto statistico. (Figura 2a). L'analisi della relazione fra ceppi virali e specie ospite ha mostrato una certa associazione, sebbene diverse eccezioni siano state dimostrate, in special modo in paesi come l'Italia dove pollo e tacchino sono allevati in stretta vicinanza. I ceppi campionati da faraona erano parte di tre differenti cluster, e i rispettivi antenati sono sempre stati predetti essere dei ceppi campionati da tacchino. Conseguentemente, i salti di specie con adeguato supporto statistico sono risultati essere fra pollo e tacchino e fra tacchino e faraona (Figura 2b).

Pressioni selettive

L'analisi delle pressioni selettive differenziali che agiscono su ceppi campionati da pollo e da tacchino ha evidenziato solo una posizione (i.e. aa 83) dove i ceppi campionati da pollo erano soggetti a pressioni selettive più intense. Parallelamente, l'analisi di pressioni selettive direzionali agenti su ceppi introdotti nel pollo ha evidenziato una tendenza a mutare verso l'aminoacido alanina in posizione 102. Ad ogni modo, quando l'azione delle forze selettive, la proporzione dei siti coinvolti e il regime selettivo (ossia la combinazione del numero di siti coinvolti e l'intensità delle pressioni) sono state comparate fra l'allineamento dei ceppi di pollo e quelli di tacchino, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative.

DISCUSSIONE

Nonostante aMPV sia un patogeno rilevante per l'allevamento avicolo in Europa, la nostra conoscenza sulla sua epidemiologia molecolare è tuttora scarsa e basata su un numero limitato di studi svolti da alcuni gruppi di ricerca. Il presente studio si propone di fornire una visione di insieme sull'epidemiologia ed evoluzione di questo virus sulla base di più robusti modelli statistici. Per fare ciò si sono dovuti superare due principali ostacoli. In primo luogo, la scarsa disponibilità di sequenze liberamente accessibili e adeguatamente annotate, che conferma la scarsa attività di sequenziamento di molti gruppi di ricerca europei. Fortunatamente, il recente rilascio di un buon numero di sequenze (Mescolini et al., 2020) raccolte da diversi paesi nel corso del tempo ha permesso di aumentare la rappresentatività del database a nostra disposizione. In secondo luogo, l'ampio uso di vaccini vivi attenuati, in grado di circolare per lunghi periodi in condizioni di campo, potenzialmente anche come ceppi revertanti (Cecchinato et al., 2014), ha complicato la differenziazione fra ceppi di campo e ceppi vaccinali o di origine vaccinale. Poiché i ceppi vaccinali sono continuamente introdotti, ma non evolvono (almeno non fino a quando non iniziano a replicare negli animali), il sequenziamento del medesimo stivite vaccinale in anni diversi può oscurare il segnale temporale e portare a dei *bias*. L'approccio utilizzato per rimuovere le sequenze di probabile origine vaccinale è parso tuttavia efficace, come dimostrato da un netto miglioramento nel segnale temporale stesso dopo la rimozione di queste sequenze. Sulla base di tali evidenze, le stime sull'origine e la storia di aMPV-B possono essere considerate affidabili. È importante notare come tale introduzione in Europa sia stata stimata in Francia nel 1981, e corrisponde in modo molto preciso ai risultati dei primi report basati su evidenze di tipo epidemiologico (Giraud et al., 1986). Successivamente, la diffusione è stata rapida, coinvolgendo inizialmente i paesi dell'Europa occidentale e mediterranea fino a circa la fine degli anni '90, quando una diffusione verso est è stata osservata indicativamente all'inizio del nuovo millennio. Nel successivo periodo è stato osservato un ampio rimescolamento fra i ceppi di aMPV campionati nell'Europa orientale e occidentale, con Francia, Italia e Spagna principalmente coinvolte nella diffusione virale in questa fase. A causa della limitata disponibilità di informazione non è semplice spiegare con precisione le cause dietro lo scenario osservato. Una simile, rapida diffusione è stata dimostrata anche per diversi genotipi della bronchite infettiva (Franzo et al., 2017a; Franco Giovanni et al., 2018). La presenza di un mercato unico europeo, il commercio di animali vivi su lunghe distanze e l'intensificarsi delle produzioni animali possono sicuramente aver favorito questo processo. Non può non essere menzionato però, che la crescente disponibilità di sequenze nel tempo aver possa aver condizionato i risultati ottenuti, permettendo di identificare una più fitta rete di contatti solo negli ultimi anni. Il ruolo di Francia e Italia nella diffusione del virus è stato a lungo attribuito alle dimensioni della popolazione di tacchini in questi stati, specie tradizionalmente considerata l'ospite principale di aMPV. Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato un'elevata presenza dell'infezione anche nei polli (Tucciarone et al., 2018; Andreopoulou et al., 2019) e la presente analisi ha dimostrato un frequente scambio di ceppi fra le 2 popolazioni, sminuendo questa ipotesi. Con buona probabilità, anche in questo caso, il maggior numero di sequenze ottenute da alcuni stati potrebbe aver portato ad una sovrastima del loro ruolo epidemiologico. Un'altra ipo-

tesi affascinante chiama in causa gli uccelli selvatici migratori (Jones, 1996). La presenza di rotte migratorie fra stati mediterranei e la Russia potrebbe giustificare il flusso virale bidirezionale fra queste regioni. Tuttavia, le limitatissime informazioni inerenti la suscettibilità dei volatili selvatici all'infezione e il loro ruolo epidemiologico impongono grande cautela (Heffels-Redmann et al., 1998). Un'ipotesi alternativa è che l'assenza di sequenze, rispondenti ai nostri criteri di inclusione, in molti Stati dell'Europa orientale possa celare un più lento processo di diffusione, come sembrano suggerire alcuni report di epidemiologia classica (Cecchinato et al., 2017). A prescindere da queste incertezze, è stato possibile evidenziare una chiara tendenza dei ceppi di aMPV-B a clusterizzare in base allo Stato di campionamento. È stato inoltre identificato un numero molto limitato di eventi introduttivi multipli. Ne consegue che, similmente a quanto dimostrato per IBV, l'introduzione di nuovi stiptipi è un evento sostanzialmente raro. Tuttavia, la capacità di contenerne la successiva diffusione all'interno di uno Stato attraverso adeguate misure di biosicurezza e controllo appare limitata. In tal senso è interessante notare come negli ultimi anni si sia osservato un trend decrescente nelle dimensioni della popolazione virale, che potrebbe essere almeno in parte ascrivibile a una maggiore applicazione in alcuni stati di protocolli vaccinali anche nei broiler. Questa evidenza è in apparente contrasto con l'attuale percezione dei veterinari di campo, che sovente riportano aMPV come una crescente problematica. Tuttavia, l'apparente aumento della prevalenza percepita potrebbe riflettere una più intensa attività diagnostica, piuttosto che un reale mutamento dello scenario epidemiologico. Sebbene non fossero stati condotti studi rigorosi, aMPV era considerato un patogeno a lenta evoluzione. Le stime ottenute dimostrano uno scenario radicalmente diverso, caratterizzato da un tasso evolutivo pienamente comparabile a quello di altri virus a RNA. Questa variabilità genotipica ha evidenti ripercussioni a livello aminoacidico. Come facilmente prevedibile, membri della stessa *clade* tendono a manifestare analoghe mutazioni aminoacidiche, pur in presenza di rilevanti eccezioni, potenzialmente classificabili come fondi-ciechi o varianti a bassa fitness, oppure come varianti emergenti non ancora diffusi. Poiché sussiste anche una chiara associazione fra localizzazione geografica e *clade*, si può concludere che Stati diversi alberghino ceppi con caratteristiche fenotipiche differenti. I vaccini attualmente in uso, sebbene efficaci nel prevenire la sintomatologia, non sono in grado di prevenire l'infezione e l'escrezione virale, contribuendo probabilmente alla persistenza della circolazione di aMPV-B nei diversi stati. Se questa variabilità fenotipica condizioni l'efficacia della vaccinazione dovrebbe essere oggetto di ulteriori studi al fine di permettere la selezione del vaccino più adeguato al peculiare contesto epidemiologico. Al contrario, non si è potuta evidenziare nessuna associazione evidente fra ospite e sequenza aminoacidica, almeno nella regione genomica considerata. Sebbene l'analisi statistica abbia evidenziato alcuni siti sottoposti ad una pressione differenziale fra ceppi campionati in pollo e tacchino, queste mutazioni interessavano un numero molto limitato di ceppi. In aggiunta, un'analisi più complessiva che prendesse in considerazione l'intero allineamento non ha evidenziato differenze significative fra le 2 specie. Nel complesso, i risultati ottenuti non sembrano sostenere la presenza di un adattamento ospite-specifico dei ceppi di aMPV-B. Se altre regioni del genoma virale siano coinvolte dovrà essere oggetto di futuri studi. In conclusione, il presente studio dimostra che dopo

la prima introduzione in Europa, aMPV-B si è rapidamente diffuso dapprima nei paesi occidentali e mediterranei e successivamente in quelli dell'est. Tuttavia, lo scenario epidemiologico è dominato principalmente da singoli eventi introduttivi, cui è seguito il mantenimento e l'evoluzione indipendente in ciascuno stato. Poiché questo ha comportato la circolazione di ceppi con caratteristiche fenotipiche differenti nei diversi paesi, l'efficacia dei singoli vaccini dovrebbe essere presa in considerazione per permetterne una somministrazione più oculata. Sebbene rilevanti, i risultati ottenuti sono senza dubbio limitati dalla numerosità di sequenze attualmente disponibili, dalla mancanza di standardizzazione nel tratto genomico sequenziato e talvolta dalla scarsa attitudine nella condivisione dei dati. Questi fattori dovrebbero essere significativamente migliorati per permettere una adeguata comprensione dell'epidemiologia e del ruolo di aMPV, permettendone un efficace controllo.

Figura 1. Ricostruzione delle dinamiche di popolazione nel corso del tempo. Il valore medio è rappresentato da una linea nera mentre il 95HPD è rappresentato dall'area ombreggiata in rosso. La ricostruzione è riportata a partire dall'origine stimata dell'antenato comune (tMRCA), il cui 95HPD superiore è riportato come una linea verticale tratteggiata.

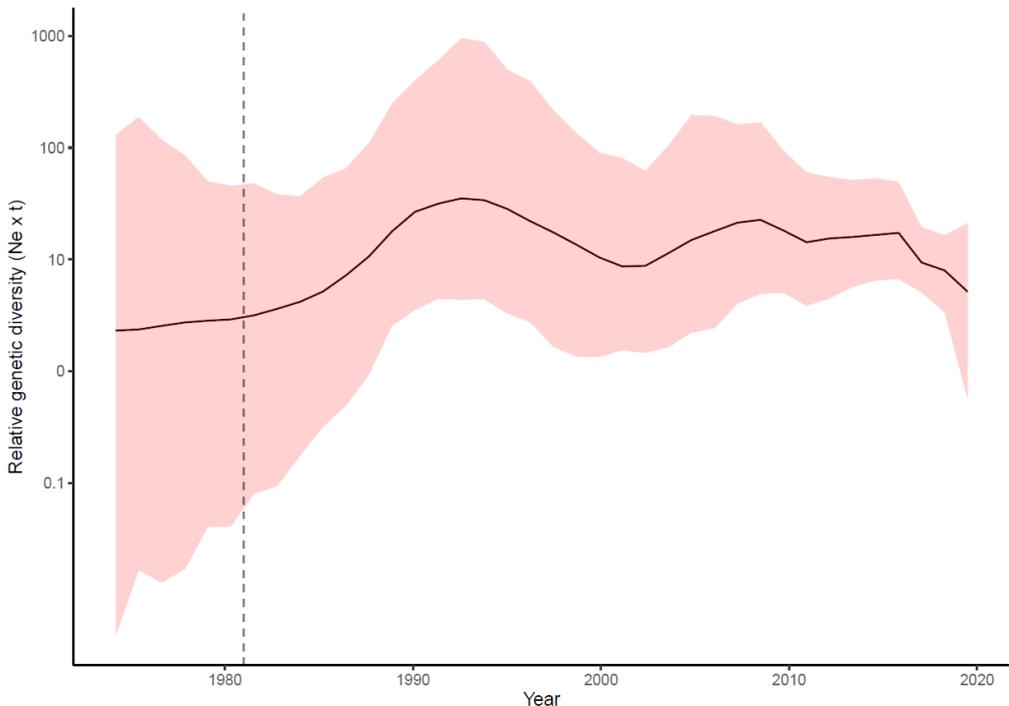
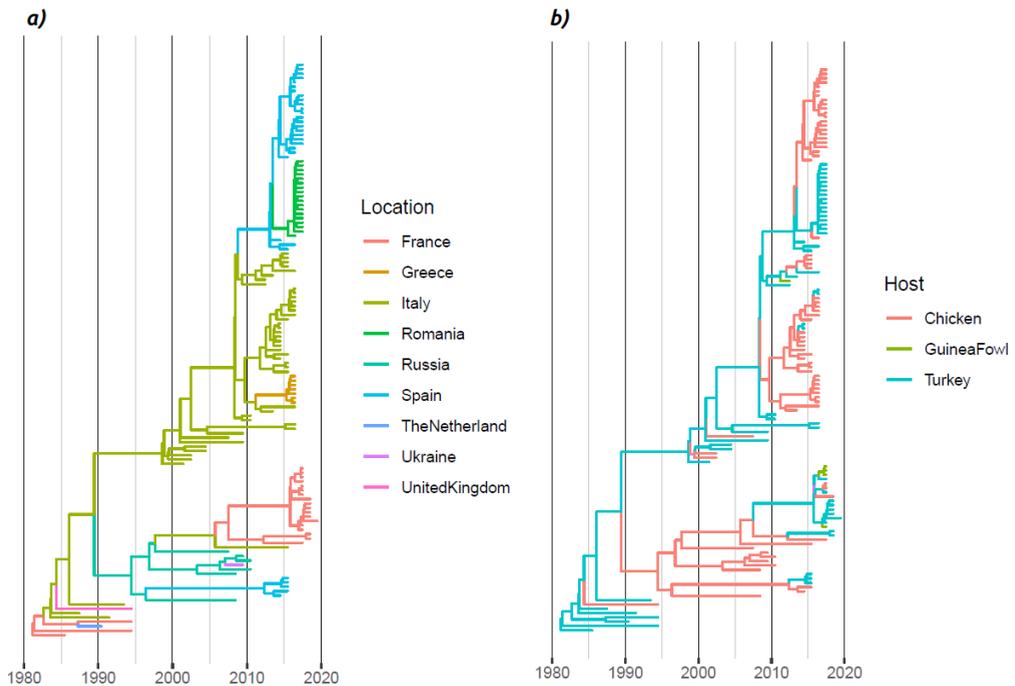


Figura 2. Maximum Clade Credibility Tree rappresentante le relazioni fra i ceppi di aMPV-B Europei, scalati nel corso del tempo. Gli Stati (a) e gli ospiti (b) in cui i ceppi sono stati campionati, e la stima della medesima caratteristica negli antenati, sono riportati utilizzando un codice-colore.



BIBLIOGRAFIA

1. Andreopoulou, M., Franzo, G., Tucciarone, C.M., Prentza, Z., Koutoulis, K.C., Cecchinato, M., Chaligianni, I., 2019. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus in Greece. *Poult. Sci.* 98, 5374–5384. doi:10.3382/ps/pez360
2. Cecchinato, M., Catelli, E., Lupini, C., Ricchizzi, E., Prosperi, S., Naylor, C.J., 2014. Reversion to virulence of a subtype B avian metapneumovirus vaccine: Is it time for regulators to require availability of vaccine progenitors? *Vaccine* 32, 4660–4664. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.030
3. Cecchinato, M., Ferreira, H.L., Munir, M., Catelli, E., 2017. Avian metapneumovirus., in: *Mononegaviruses of Veterinary Importance. Volume 2: Molecular Epidemiology and Control.* CABI, pp. 127–143. doi:10.1079/9781780644172.0127
4. Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214. doi:10.1186/1471-2148-7-214

5. Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C.M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., Ciccozzi, M., Lavazza, A., Cecchinato, M., Moreno, A., 2017a. 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. doi:10.1371/journal.pone.0184401
6. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Enache, M., Bejan, V., Ramon, G., Koutoulis, K.C., Cecchinato, M., 2017b. First Report of Avian Metapneumovirus Subtype B Field Strain in a Romanian Broiler Flock During an Outbreak of Respiratory Disease. *Avian Dis.* 61, 250. doi:10.1637/11557-121216-resnote.1
7. Franzo, G., Cecchinato, M., Tosi, G., Fiorentini, L., Faccin, F., Tucciarone, C.M., Trogu, T., Barbieri, I., Massi, P., 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, e0203513. doi:10.1371/journal.pone.0203513
8. Gill, M.S., Lemey, P., Faria, N.R., Rambaut, A., Shapiro, B., Suchard, M.A., 2013. Improving Bayesian Population Dynamics Inference: A Coalescent-Based Model for Multiple Loci. *Mol. Biol. Evol.* 30, 713–724. doi:10.1093/molbev/mss265
9. Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M., Toquin, D., others, 1986. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet. Rec.* 119, 606–607.
10. Heffels-Redmann, U., Neumann, U., Braune, S., Cook, J.K.A., Prüter, J., 1998. Serological evidence for susceptibility of sea gulls to avian pneumovirus (APV) infection., in: *Proceedings International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry*, Raischholzhausen, Germany, 15-18 June 1998. pp. 23–25.
11. Jones, R.C., 1996. Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. *Avian Pathol.* doi:10.1080/03079459608419171
12. Juhasz, K., Easton, A.J., 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: Evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75, 2873–2880. doi:10.1099/0022-1317-75-11-2873
13. Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A.J., Suchard, M.A., 2009. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000520. doi:10.1371/journal.pcbi.1000520
14. Mescolini, G., Lupini, C., Franzo, G., Quaglia, G., Legnardi, M., Cecchinato, M., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Turblin, V., Biarnés, M., Tatone, F., Falchieri, M., Catelli, E., 2020. What is new on molecular characteristics of Avian metapneumovirus strains circulating in Europe? *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13788. doi:10.1111/tbed.13788
15. Pond, S.L.K., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., Frost, S.D.W., Kosakovsky Pond, S.L., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., Frost, S.D.W., 2006. GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22, 3096–3098. doi:btl474 [pii]
16. Rambaut, A., Lam, T.T., Max Carvalho, L., Pybus, O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2, vew007. doi:10.1093/ve/vew007

17. Standley, K., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.(outlines version 7). *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010 [doi]
18. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W232–W235. doi:10.1093/nar/gkw256
19. Tucciarone, C.M., Franzo, G., Lupini, C., Alejo, C.T., Listorti, V., Mescolini, G., Brandão, P.E., Martini, M., Catelli, E., Cecchinato, M., 2018. Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97, 503–509. doi:10.3382/ps/pex350