

DIAGNOSI MOLECOLARE DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE: COME LA SCELTA DEL PROTOCOLLO E LA CONCENTRAZIONE VIRALE POSSONO INFLUENZARE L'IDENTIFICAZIONE E LA CARATTERIZZAZIONE DEL VIRUS IN PRESENZA DI COINFEZIONI

Tucciarone C.M.¹, Legnardi M.¹, Franzo G.¹, Fortin A.², Valastro V.², Terregino C.², Cecchinato M.¹

¹ *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro PD, Italia;*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro PD, Italia.*

Summary

Although a great effort has been made to achieve a consistent infectious bronchitis virus (IBV) classification scheme based on the complete S1 gene, economic and time constraints in diagnostic routine often lead to sequence partial S1 regions for IBV genetic characterization. In this context, Sanger sequencing remains the most common and cost-effective option, even if partial results are likely obtained by analyzing samples where multiple field and vaccine strain populations coexist. In the present study, three commonly used RT-PCR methods targeting two regions of the S1 gene were evaluated and compared on 30 specimens tested in triplicate. In detail, test samples were prepared by artificially mixing two vaccine strains, combined at different concentrations and selected among four different IBV *lineages*, i.e. GI-1 (Mass), GI-13 (793/B), GI-19 (QX), GI-23 (Israeli Variant 2). The main goal was to investigate the possible bias in IBV detection and characterization due to the RT-PCR method adopted, the different strains as well as their ratio in the test sample.

Sequence analysis revealed that the three assays yielded consistent results for the majority of the tested samples. When discrepancies occurred, these were likely caused by primer affinity and target amount. Overall, these results confirm the complexity of IBV strain identification process and highlight the importance of a critical evaluation of the obtained results and frequent update the available diagnostic assays for a reliable detection of all the circulating IBV strains. Furthermore, a panel of different molecular assays enabling the simultaneous identification of the multiple IBV strains is recommended to achieve a complete picture of the coexisting strains.

INTRODUZIONE

La Bronchite Infettiva è una delle patologie più comuni nell'ambito della produzione avicola, con un forte impatto economico sull'allevamento ascrivibile alle minori performance produttive, alle misure di profilassi e contenimento, ma anche ai costi di monitoraggio e diagnosi. La complessità nella gestione di questa malattia è determinata principalmente dalla notevole variabilità genetica dell'agente eziologico, il virus della Bronchite infettiva (IBV), che ha dato origine alla comparsa di numerose varianti (Valastro et al., 2016). Queste caratteristiche rendono spesso necessario lo sviluppo di approcci diagnostici alternativi e di strategie vac-

ciali adattate alla situazione epidemiologica locale e talvolta alla singola azienda. Fin dalla comparsa di questo virus, la ricerca di protocolli vaccinali efficaci è stata incessante. Numerosi studi condotti per valutare la cross-protezione tra ceppi hanno portato all'individuazione di alcune combinazioni di varianti vaccinali in grado di garantire un ampio livello di protezione nei confronti di un buon numero di ceppi comunemente circolanti (Cook et al., 1999). Vero è che la comparsa di una nuova variante spesso comporta la revisione del protocollo vaccinale, al fine di assicurare un'adeguata risposta immunitaria degli animali.

Il protocollo vaccinale che di consueto viene adottato è basato sulla somministrazione simultanea di almeno due vaccini vivi attenuati, di cui uno generalmente è rappresentato da un ceppo GI-I (Mass) e l'altro da uno di tipo GI-13 (793B) (Cook et al., 1999; Awad et al., 2016; Terregino et al., 2008), oppure derivato da ceppi indigeni circolanti sul territorio in modo da introdurre nella vaccinazione una componente omologa. In particolare in Italia, dove la circolazione del *lineage* GI-19 (QX) è predominante e fortemente penalizzante, la combinazione di vaccini Mass e QX risulta largamente utilizzata (Franzo et al., 2017; Franco et al., 2020).

In questo contesto si rivela quindi indispensabile considerare il piano di vaccinazione nell'interpretazione dei dati epidemiologici e dell'esito degli approfondimenti diagnostici. È stato infatti dimostrato che ceppi vaccinali in replicazione possono essere identificati ad alti titoli anche in fasi avanzate del ciclo produttivo (Tucciarone et al., 2018) e che la persistenza a livello locale di alcuni genotipi può essere causata dalla vaccinazione (Franzo et al., 2014). Inoltre, anche in presenza di condizioni epidemiologiche simili, uniformare i programmi vaccinali sul territorio rimane complicato (Legnardi et al., 2019). Questi elementi, insieme alla circolazione di ceppi di campo, rendono pressoché inevitabile la contemporanea presenza di più varianti nello stesso animale o allevamento e complicano la diagnosi, specialmente quando questa è eseguita su pool di campioni ottenuti da soggetti diversi.

Allo scopo di poter individuare il maggior numero di ceppi presenti in un campione diagnostico, numerosi laboratori adottano un panel di metodiche real time RT-PCR specifiche per i diversi *lineage*. Questo approccio però raramente è in grado di discriminare l'origine vaccinale o di campo del *lineage* rilevato, rendendo talvolta necessario il ricorso a metodiche di RT-PCR classiche seguite da sequenziamento nel tentativo di ottenere una più fine caratterizzazione. L'approccio diagnostico resta comunque eterogeneo, sia nell'algoritmo procedurale sia nelle metodiche adottate (Monne, 2016). Partendo dalle criticità sopra descritte, il presente studio compara tre delle metodiche di RT-PCR più comunemente usate, allo scopo di valutare differenze nell'*outcome* diagnostico dopo sequenziamento di campioni creati *ah hoc* per mimare il frequente scenario di "coinfezione" di un campione diagnostico.

MATERIALI E METODI

Per assicurare la presenza di un solo ceppo all'interno del campione, sono stati scelti quattro vaccini comunemente usati dei *lineage* GI-I (Ma5), GI-13 (4/91), GI-19 (QX) e GI-23 (Israeli Variant 2). I vaccini sono stati ricostituiti in 5 ml di PBS e l'RNA è stato estratto con il kit High Pure Viral RNA Kit (Roche). L'RNA di ogni ceppo è stato quindi diluito serialmente e le diluizioni ottenute sono state testate

con una metodica real time RT-PCR in grado di amplificare la regione conservata UTR (Callison et al., 2006). Per ottenere campioni omogenei, i vaccini sono stati diluiti fino ad una concentrazione rilevata in real time RT-PCR pari a circa 18 Ct, considerata come concentrazione tal quale (tq) nel presente studio. Oltre a questa, sono state utilizzate le diluizioni 1:100 (-2) e 1:10000 (-4) dei tal quali. Dalla combinazione di genotipi e concentrazioni sono stati ottenuti 30 campioni (Tabella 2) che sono stati amplificati in triplicato con tre differenti metodiche (Tabella 1). Gli amplificati ottenuti sono stati visivamente valutati dopo elettroforesi capillare e sequenziati con metodo Sanger utilizzando i primer delle rispettive metodiche. I cromatogrammi sono stati analizzati qualitativamente e le regioni iniziali e terminali in corrispondenza dell'incorporazione dei primer sono state rimosse. Le sequenze nucleotidiche ottenute in *forward* e *reverse* sono state riportate in formato FASTA mediante il software FinchTV (Geospiza, Inc.) e archiviate in un file dedicato per ogni *run* e metodica al fine di valutarne la concordanza. Le sequenze consenso sono state generate e controllate con il software ChromasPro 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd). I nucleotidi classificati come dubbi dal software sono stati manualmente corretti dall'operatore, quando la qualità del cromatogramma lo permetteva. Le sequenze nucleotidiche dei consensi così ottenute sono state riportate in formato FASTA in file dedicati.

L'allineamento preliminare delle sequenze è stato effettuato entro *run* ed entro metodica tramite MAFFT version 7 (Rozewicki et al., 2019) inserendo le 4 sequenze di riferimento dei *lineage* utilizzati (KU736747 (GI-I), AF093793 (GI-13), DQ674739 (GI-19), HM131453 (GI-23)). Il software MEGAX (Kumar et al., 2018) è stato utilizzato per l'analisi filogenetica condotta con metodo Maximum Likelihood (ML).

RISULTATI E DISCUSSIONE

A seguito dell'amplificazione dei campioni con le tre metodiche nelle tre *run* indipendenti, tutti i campioni sono risultati positivi, tranne il campione 1 nella *run* 2 con la metodica C (Valastro et al. 2010) anche se molti di questi sono risultati non sequenziabili (Tabella 3). Inoltre, in alcune *run* non è stato possibile ottenere entrambe le sequenze *forward* e *reverse*, ma solo una delle due (Tabella 4).

Una ripetibilità sub-ottimale è emersa nella capacità di ottenere una sequenza di qualità adeguata. I campioni più critici sono stati quelli con una minore concentrazione di RNA target, o quelli ottenuti combinando i 2 vaccini a concentrazione simile. In realtà, anche a basse concentrazioni non si sono evidenziati particolari limiti di sensibilità delle metodiche, le cui performance risultano elevate.

La coesistenza nei campioni di due diverse popolazioni virali ha inciso piuttosto sul sequenziamento. In alcuni casi, gli elettroferogrammi presentavano infatti doppi picchi e un forte segnale di background che rendeva non chiara la determinazione e l'interpretazione della sequenza nucleotidica. In questi casi, l'ispezione delle sequenze in fase di assemblaggio del consenso e la procedura di conferma dei nucleotidi in posizioni dubbie sono azioni operatore-dipendenti che possono influenzare il risultato e determinare, per quanto in cieco, la prevalenza di una sequenza di migliore qualità sull'altra.

Una buona ripetibilità è stata invece dimostrata comparando le *run* di ogni metodica. Solo con la metodica A (Cavanagh et al., 1999) si è ottenuta una classificazione

discordante tra le sequenze *forward* e *reverse* di un campione (n. 5), probabilmente a causa di una diversa affinità dei primer per i due target presenti nel campione. Le tre metodiche hanno mostrato qualche differenza nella capacità di identificare i ceppi presenti nei campioni. I risultati ottenuti con la metodica A sembrano essere influenzati prevalentemente dalla quantità di target e restituiscono primariamente la sequenza del ceppo presente a maggior concentrazione. La metodica B (Worthington et al., 2008) ha invece mostrato di essere ceppo-dipendente. La natura “*nested*” di questa RT-PCR accentua la maggiore affinità dei primer di questa metodica per i ceppi 4/91 e Mass rispetto a Israeli Variant 2 e soprattutto QX e restituisce output di sequenze migliori sia a livello quantitativo sia qualitativo (Tabella 4). Il *lineage* QX, seguito da 4/91, è stato identificato nel maggior numero di campioni dalla metodica C (Valastro et al., 2010). Questo test sembra risentire più degli altri della presenza di ceppi multipli. Infatti, delle tre metodiche è quella che con maggior frequenza (Tabella 4), in presenza di concentrazioni analoghe di due *lineage*, non ha permesso l’ottenimento di sequenze di qualità adeguata. I risultati qui riportati, per quanto preliminari e da approfondire con valutazioni statistiche, mostrano ancora una volta la complessità della diagnosi dell’IBV. Ogni metodica risponde ad esigenze diagnostiche o di ricerca particolari, che possono condizionarne l’inclusività e renderla più o meno specifica. Il disegno dei primer, la variabilità della regione target, la disponibilità in banche dati delle sequenze dei ceppi di interesse, sono solo alcuni degli elementi che possono influenzare la natura stessa di una metodica e la sua efficienza nell’identificare un ceppo piuttosto che un altro. Inoltre, la riproduzione artificiale di una coinfezione ha sicuramente esacerbato le difficoltà di identificazione. Raramente in condizioni di campo vengono raccolti campioni che contengono concentrazioni simili, perciò il rilievo di doppi picchi o di background nei cromatogrammi è stato probabilmente sovrastimato in questo studio. Al contrario, in condizioni di campo, risulta più frequente l’impossibilità di amplificazione o sequenziamento causata dalla scarsa concentrazione virale o dalla degradazione dell’RNA. Nel caso poi di un’infezione attiva, si può realisticamente presumere che il ceppo di campo raggiunga titoli superiori a quelli di un vaccino eventualmente persistente. Il problema diagnostico insorge piuttosto nelle fasi precoci o tardive di infezione, in cui i titoli virali negli animali possono essere ancora bassi. La complessità della Bronchite Infettiva non si limita quindi solo agli aspetti clinici, epidemiologici o di controllo. La componente diagnostica è altrettanto coinvolta. Per tale ragione, le informazioni correlate al campione clinico, come l’anamnesi clinica e vaccinale, dovrebbero essere fornite e considerate per la scelta dell’algoritmo diagnostico più idoneo e/o per l’eventuale ricorso ad ulteriori approfondimenti diagnostici per confermare risultati dubbi o inattesi.

Tabella 1: dettagli dei metodi utilizzati.

Metodo	RT-PCR	Forward primer	Reverse primer	Riferimento bibliografico
A	One Step RT-PCR	XCE1+	XCE2-	Cavanagh et al., 1999
B	Two Step nested RT-PCR	SX1+ SX3+	SX2- SX4-	Worthington et al., 2008
C	One Step RT-PCR	IBV260+	IBV548-	Valastro et al., 2010

Tabella 2: composizione dei campioni (Var2: Israeli variant 2).

Campione	Combinazione		Diluizione		Campione	Combinazione		Diluizione	
	Ceppo 1	Ceppo 2	Ceppo 1	Ceppo 2		Ceppo 1	Ceppo 2	Ceppo 1	Ceppo 2
1	Ma5	4/91	tq	-4	16	QX	Var2	tq	-4
2	Ma5	4/91	-2	-2	17	QX	Var2	-2	-2
3	Ma5	4/91	-4	tq	18	QX	Var2	-4	tq
4	Ma5	4/91	tq	tq	19	QX	Var2	tq	tq
5	Ma5	4/91	-4	-4	20	QX	Var2	-4	-4
6	Ma5	QX	tq	-4	21	QX	4/91	tq	-4
7	Ma5	QX	-2	-2	22	QX	4/91	-2	-2
8	Ma5	QX	-4	tq	23	QX	4/91	-4	tq
9	Ma5	QX	tq	tq	24	QX	4/91	tq	tq
10	Ma5	QX	-4	-4	25	QX	4/91	-4	-4
11	Ma5	Var2	tq	-4	26	Var2	4/91	tq	-4
12	Ma5	Var2	-2	-2	27	Var2	4/91	-2	-2
13	Ma5	Var2	-4	tq	28	Var2	4/91	-4	tq
14	Ma5	Var2	tq	tq	29	Var2	4/91	tq	tq
15	Ma5	Var2	-4	-4	30	Var2	4/91	-4	-4

Tabella 3: Numero di campioni non sequenziabili per metodica.

Metodo	Run 1	Run 2	Run 3	Totale	Riferimento bibliografico
A	6	2	6	14	Cavanagh et al., 1999
B	3	6	3	12	Worthington et al., 2008
C	6	7	4	17	Valastro et al., 2010

Tabella 4: risultati ottenuti con le tre metodiche nelle tre *run* indipendenti. In rosso il campione negativo; in verde i risultati discordanti entro run; in blu i risultati discordanti tra metodiche (* presenza di mismatches rispetto alla sequenza di riferimento; n.s.: campione non sequenziabile; Interm.: sequenza intermedia tra 4/91 e Mass.; Var2: Israeli variant 2).

A(XCE1+XCE2)						B(SX3+SX4)						C(HV26+HBV58)														
ID	Combinazione	Divisione	R1N1			R1N3			R2N1			R2N2			R2N3			R2N1			R2N2			R2N3		
			F	R	Consenso	F	R	Consenso	F	R	Consenso	F	R	Consenso	F	R	Consenso	F	R	Consenso	F	R	Consenso	F	R	Consenso
1	Mas-491	tg-4	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5*	Mas5	Mas5	491	491*	491	Mas5	Mas5	Consenso
2		-2-2	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	n.s.	
3		-4/q	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491*	491	491	491	491	491	491	491	n.s.
4		tg/q	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	n.s.
5		-4-4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	491	Mas5	Interm.	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	n.s.
6	Mas-QX	Tg-4	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5
7		-2-2	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5*	Mas5*	Mas5*	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	n.s.	
8		-4/q	QX	QX	QX	QX	QX	QX*	QX	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	n.s.
9		q/q	n.s.	n.s.	n.s.	Mas5	Mas5*	Mas5*	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	QX	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	n.s.
10		-4-4	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	n.s.	Mas5	n.s.	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	n.s.
11	Mas-Var2	tg-4	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5
12		-2-2	Mas5	n.s.	n.s.	Mas5	n.s.	n.s.	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2*	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	
13		-4/q	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	
14		tg/q	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2*	Var2	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5
15		-4-4	Var2	n.s.	n.s.	Var2	Var2	Var2	Var2	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	Mas5	n.s.
16	QX-Var2	tg-4	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	
17		-2-2	n.s.	n.s.	n.s.	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2*	Var2*	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	
18		-4/q	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	
19		tg/q	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2*	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	n.s.
20		-4-4	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	n.s.
21	QX-491	tg-4	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	QX	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	
22		-2-2	491*	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	
23		-4/q	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	
24		tg/q	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	
25		-4-4	n.s.	491	n.s.	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491
26	Var2-491	tg-4	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	
27		-2-2	n.s.	n.s.	n.s.	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	
28		-4/q	n.s.	n.s.	n.s.	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	
29		tg/q	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	
30		-4-4	491*	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491
Totale sequenze caratterizzate			23	22	21	27	27	26	24	23	24	24	24	24	25	26	25	22	20	18	20	19	18	24	22	20

BIBLIOGRAFIA

1. Awad, F., Hutton, S., Forrester, A., Baylis, M., & Ganapathy, K. (2016). Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathology*, 45(2), 169-177.
2. Bru, T., Vila, R., Cabana, M., & Geerligs, H. J. (2017). Protection of chickens vaccinated with combinations of commercial live infectious bronchitis vaccines containing Massachusetts, Dutch and QX-like serotypes against challenge with virulent infectious bronchitis viruses 793B and IS/1494/06 Israel variant 2. *Avian pathology*, 46(1), 52-58.
3. Callison, S. A., Hilt, D. A., Boynton, T. O., Sample, B. F., Robison, R., Swayne, D. E., & Jackwood, M. W. (2006). Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of virological methods*, 138(1-2), 60-65.
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 reactions. *Avian Pathology*, 28(6), 593-605.
5. Cook, J. K., Orbell, S. J., Woods, M. A., & Huggins, M. B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology*, 28(5), 477-485.
6. Franzo, G., Naylor, C. J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., ... & Cecchinato, M. (2014). Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine*, 32(50), 6765-6767.
7. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Blanco, A., Nofrarias, M., Biarnés, M., Cortey, M., ... & Cecchinato, M. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine*, 34(46), 5670-5676.
8. Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C. M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., ... & 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), e0184401.
9. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Moreno, A., Legnardi, M., Massi, P., Tosi, G., ... & Gavazzi, L. (2020). Phylodynamic analysis and evaluation of the balance between anthropic and environmental factors affecting IBV spreading among Italian poultry farms. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
10. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
11. Legnardi, M., Franzo, G., Koutoulis, K. C., Wiśniewski, M., Catelli, E., Tucciarone, C. M., & Cecchinato, M. (2019). Vaccine or field strains: the jigsaw pattern of infectious bronchitis virus molecular epidemiology in Poland. *Poultry science*, 98(12), 6388-6392.
12. Monne, I. (2016). Stability and diversity: the Yin and Yang of gammacoronaviruses genome. Proc. 9th International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Leusden, The Netherlands, 21-24 June 2016.

13. Rozewicki, J., Li, S., Amada, K. M., Standley, D. M., & Katoh, K. (2019). MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic acids research*, 47(W1), W5-W10.
14. Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., ... & Capua, I. (2008). Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathology*, 37(5), 487-493.
15. Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., ... & Cecchinato, M. (2018). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-Time RT-PCR quantification. *Poultry science*, 97(1), 303-312.
16. Valastro, V., Monne, I., Fasolato, M., Cecchetti, K., Parker, D., Terregino, C., & Cattoli, G. (2010). QX-type infectious bronchitis virus in commercial flocks in the UK. *Veterinary Record*, 167(22), 865-866.
17. Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349-364.
18. Worthington, K. J., Currie, R. J. W., & Jones, R. C. (2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*, 37(3), 247-257.