

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DI VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE ISOLATI IN ITALIA NEL PERIODO 2007-2009 E NEL PRIMO BIMESTRE DEL 2010

Tosi G.¹, Taddei R. ¹, Barbieri I. ², Fiorentini L. ¹, Massi P. ¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione Diagnostica di Forlì.*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Reparto di Genomica – Sede di Brescia.*

Riassunto

Sono stati caratterizzati (mediante RT-PCR e/o sequenziamento) 368 ceppi di virus della bronchite infettiva aviare (IBV) rilevati in Italia nel triennio 2007-2009 e 40 ceppi di IBV rilevati nei primi due mesi del 2010. Nel corso del periodo considerato e, in particolare, all'inizio del 2010 la circolazione dei differenti genotipi di IBV sembra essersi diversificata. La prevalenza del ceppo 793B sembra infatti in diminuzione, mentre la circolazione dei genotipi QX e IT-02 appare in aumento. Si segnala inoltre la recente ricomparsa, sia pure in forma sporadica, dei genotipi D274 e B1648.

Abstract

A molecular survey of IBV strains detected in Italy during the period 2007-2009 (and during the first two months of 2010) was performed. Serotype 793B is still the most prevalent IBV strain affected the Italian poultry industry. However, an increase of the prevalence of QX strain and IT-02 strain was observed, especially during the beginning of this year. In addition, other IBV strains (D274 and B1648) reappeared in Italy.

Introduzione

La bronchite infettiva aviare è sostenuta da un virus (IBV) appartenente alla famiglia *Coronaviridae* e al genere *Coronavirus*. Si tratta di una patologia largamente diffusa e responsabile di elevate perdite economiche nell'allevamento intensivo del pollo. Le problematiche legate al controllo della malattia sono causate soprattutto dalla notevole variabilità antigenica dei ceppi di IBV presenti nel territorio e alla periodica comparsa di nuovi sierotipi, genotipi e patotipi. L'identificazione dei ceppi di IBV è perciò importante per poter predisporre adeguati programmi vaccinali. Per questo motivo è stata condotta una caratterizzazione molecolare dei ceppi di IBV evidenziati mediante RT-PCR da materiale diagnostico conferito presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì. I dati raccolti si riferiscono al periodo 2007-2009 e al primo bimestre del 2010.

Materiali e Metodi

Per lo studio sono stati utilizzati i dati relativi al materiale diagnostico (animali vivi con segni clinici, animali deceduti, visceri, tamponi tracheali) che, sulla base dei dati anamnestici e clinici riportati dal veterinario aziendale e delle lesioni anatomo-patologiche osservate in sede necroscopica, erano riconducibili ad un sospetto di infezione da virus della bronchite infettiva aviare (IB). Oltre all'esecuzione di approfondimenti diagnostici per escludere la presenza di altri agenti infettivi, su campioni di organo prelevati in sede autoptica (oppure direttamente dai tamponi

tracheali prelevati in allevamento) veniva condotta la ricerca del virus IBV mediante RT-PCR: L'RNA totale veniva estratto utilizzando il kit di estrazione RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornita dalla ditta produttrice. Una prima RT-PCR di screening per la ricerca di IBV veniva allestita utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®) e primer specifici per una porzione di 383 bp del gene S (4). In particolare, in 25µl totali venivano miscelate le seguenti componenti: 600nM di ogni primer (XCE1+, XCE3-), 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).

In caso di positività, il prodotto di amplificazione veniva sottoposto ad una PCR duplex emi-nested (kit AccuPrime™ Taq DNA polymerase System, Invitrogen®) utilizzando lo stesso primer reverse impiegato nella prima PCR (XCE3-) e due differenti primer forward, BCE1+ e MCE1+, specifici per il sierotipo 793/B e M41 rispettivamente (4). In 25µl totali venivano miscelate le seguenti componenti: 200nM di ognuno dei 3 primer, 2,5 µl di 10x AccuPrime™ PCR Buffer II, 1 µl di AccuPrime™ Taq DNA polymerase e 2 µl di DNA amplificato. Profilo di amplificazione: 1 X (94°C, 2 min), 35 X (94°C, 30 sec; 55°C, 30sec, 68°C, 1 min), 1 X (68°C, 7 min).

Nei casi in cui la seconda PCR risultava negativa, l'amplificato ottenuto dalla prima RT-PCR di screening veniva sottoposto a sequenziamento. Le reazioni di sequenza venivano 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, impiegando la stessa coppia di primers utilizzata nell'amplificazione (XCE1+, XCE3-). Le reazioni di sequenza venivano sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga 3130 (Applied Biosystems®). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v7.0 (DNASTAR Inc., Madison®, WI, USA). Tutti i ceppi di IBV evidenziati mediante RT-PCR nel 2010 sono stati sottoposti direttamente a sequenziamento.

Dato che la caratterizzazione molecolare non è in grado di differenziare i ceppi di campo dai ceppi vaccinali vivi attenuati, per l'elaborazione dei dati si è deciso di utilizzare solo i casi che rispondevano ai seguenti criteri: presenza di dati anamnestici, segni clinici e lesioni anatomico-patologiche riferibili ad un sospetto di IB, esclusione di altri agenti infettivi di tipo respiratorio, impiego di ceppi vaccinali diversi rispetto al ceppo di IBV evidenziato a livello molecolare oppure gruppi vaccinati da almeno tre settimane nei confronti del ceppo di IBV riscontrato. Quest'ultimo parametro è stato ricavato dai dati disponibili in letteratura sulla capacità della metodica RT-PCR di rilevare il virus IBV dalla trachea (6).

E' stata infine condotta un'elaborazione più dettagliata dei casi riferibili al genotipo QX, in quanto di più recente comparsa nel nostro paese.

Risultati

Sono stati considerati (nel triennio 2007-2009) 368 casi di infezione da IBV, a cui si aggiungono 40 casi rilevati nel primo bimestre del 2010. Circa la metà (50,3% nel triennio, 57,5% nel 2010) provenivano da gruppi allevati in Emilia Romagna. L'analisi dettagliata dei dati raccolti è riportata nelle tabelle (da tabella 1 a tabella 11).

Discussione

Lo scopo dell'indagine consisteva nel fornire un quadro della situazione epidemiologica dell'infezione da IBV negli ultimi anni, con particolare riguardo all'evoluzione dei genotipi di IBV presenti sul territorio. Trattandosi di materiale diagnostico conferito presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì, i dati raccolti si riferiscono prevalentemente alla situazione dei gruppi allevati in Romagna. Non mancano tuttavia spunti di riflessione anche nei confronti di altre regioni del nostro paese. Sia pure con qualche oscillazione, i casi di infezione da IBV si sono verificati con una certa regolarità nel triennio considerato, con aumenti di prevalenza nel periodo invernale (come evidenziato dai 40 casi riscontrati nei primi due mesi di quest'anno). Va ricordato che i casi studiati non sono frutto di un campionamento sistematico, ma del conferimento volontario di materiale diagnostico presso il laboratorio da parte dei veterinari aziendali. Per questo motivo non è possibile, sulla base dei dati raccolti, una valutazione precisa della prevalenza dell'infezione nel territorio.

Le positività da genotipo 793B si mantengono su valori elevati (sia pure in flessione, a partire dal 2008, come % sul totale dei genotipi evidenziati). I casi osservati hanno riguardato prevalentemente il pollo da carne e sono stati caratterizzati soprattutto da sindromi respiratorie comparse dopo i 40 giorni di età. Com'è noto la profilassi immunizzante (con vaccini vivi attenuati) nei confronti del sierotipo 793B è largamente diffusa in tutte le tipologie produttive. La caratterizzazione molecolare impiegata in questo studio non è in grado di differenziare i ceppi di campo da quelli vaccinali. Per questo motivo i casi considerati nell'indagine sono stati selezionati su base clinico-anamnestica (come descritto nel paragrafo "materiali e metodi") per ridurre al minimo il rischio di rilevare ceppi vaccinali di IBV.

Analogamente a quanto rilevato in altri studi (8) la circolazione del genotipo M41 appare in calo in questi ultimi anni (anche se un lieve incremento è stato osservato a partire dal 2008). A differenza del genotipo 793B la sua diffusione appare distribuita in maniera regolare tra le differenti tipologie produttive.

Dopo essersi attestato al 16,5% nel 2007 (sul totale dei genotipi osservati) il genotipo IT-02 ha subito una flessione nei due anni seguenti. La sua diffusione appare tuttavia in ripresa nei primi mesi dell'anno in corso. La presenza di questo genotipo è stata rilevata prevalentemente nel pollo da carne, associata a sindromi respiratorie e a problemi di difformità nei gruppi colpiti. A differenza del genotipo 793B la diffusione del genotipo IT-02 appare distribuita in modo regolare durante tutto il ciclo produttivo del broiler.

Segnalato in Europa a partire dal 2002 (3) e in Italia a partire dal 2005 (2), il genotipo QX si è ormai diffuso in tutte le tipologie produttive. Sulla base dei dati raccolti nello studio la presenza del genotipo QX è stata riscontrata in 11 regioni italiane. Come evidenziato dalle tabelle 7,8, 9 e 10, accanto alle tipiche forme nefropatogene il genotipo QX appare coinvolto anche in sindromi respiratorie senza interessamento renale. Il tropismo dei ceppi QX per l'epitelio della mucosa respiratoria è del resto già stato dimostrato sperimentalmente (1). E' da segnalare il riscontro del genotipo QX in un gruppo di galline ovaiole da consumo colpite, a 19 settimane di età, da una sindrome respiratoria. A partire dalle 22 settimane di età il gruppo ha cominciato a presentare quadri anatomo-patologici riferibili alla cosiddetta "sindrome delle false ovaiole" che alcuni lavori scientifici mettono in relazione proprio all'infezione da ceppi QX o "QX-like", ma in una fase precoce del ciclo di sviluppo (7). Sono inoltre da segnalare due casi di infezione da genotipo QX in gruppi di fagiani (*Phasianus colchicus*) con interessamento renale o respiratorio/renale.

Nel fagiano è stata inoltre evidenziata la presenza dei genotipi 793B (7 casi) e M41 (2 casi) in corso di forme respiratorie e in gruppi non vaccinati nei confronti del virus IBV. Nel 2007 è stata inoltre rilevata la presenza del genotipo 793B in un gruppo di galline faraone (*Numida meleagris*) colpite da una sindrome respiratoria e non vaccinate nei confronti del virus IBV. Il gruppo colpito non presentava connessioni epidemiologiche con allevamenti di polli. In letteratura sono riportati rari casi di isolamento e di riproduzione sperimentale dell'infezione da IBV in questa specie (5).

Va sottolineata, tra la fine del 2009 e l'inizio del 2010, la ricomparsa sul territorio nazionale della cosiddetta "variante olandese" D274. I casi osservati riguardano due gruppi di polli da carne (di 25 e 52 giorni di età rispettivamente) e un allevamento di pollastre da riproduzione di 60 giorni di età. Tutti i gruppi osservati presentavano una sindrome di tipo respiratorio e non erano vaccinati nei confronti del genotipo D274.

Si riporta infine un caso di genotipo B1648, all'inizio del 2010, in un gruppo di polli colorati colpiti, attorno ai 90 giorni di età, da una sindrome respiratoria.

Sulla base dei dati raccolti nei primi due mesi del 2010 (e che pertanto andranno valutati su un periodo più ampio) la prevalenza dei genotipi di IBV nel territorio appare diversificata. Accanto ad una diminuzione della diffusione del sierotipo 793B si assiste ad un incremento dei genotipi QX e IT-02 e alla sia pur sporadica ricomparsa dei ceppi D274 e B1648.

Bibliografia

1. Abd El Rahman S., El-Kenawy A.A., Neumann U., Herrler G, Winter C., 2009. Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 38:41-45.
2. 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.
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. Ito N.M.K., Miyaji C.I., Capellaro C.E.M., 1991. Studies on broiler's IBV and IB-like virus from guinea fowl. *Proceedings of the II international symposium on infectious bronchitis*, Giessen, 302-307.
6. 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.
7. Landman W.J.M., Dwars R.M., De Wit J.J., 2005. High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection. *Proceedings of the 14th world veterinary poultry congress*, 22-26 august 2005, pag.369.
8. Moreno A., Fallacara F., Tosi G., Massi P., 2007. Caratterizzazione molecolare di ceppi di virus della bronchite infettiva aviaria isolati in Italia tra il 2005 e il 2007. *Atti del workshop di virologia veterinaria*, 7-8 giugno 2007, Bologna, pag.55.

Tabella 1. Distribuzione geografica dei ceppi di IBV.

REGIONE	2007	2008	2009	2010
Abruzzo	4	4	0	0
Basilicata	0	1	2	0
Calabria	0	0	9	1
Campania	1	3	5	3
Emilia Romagna	64	49	67	23
Friuli Venezia Giulia	4	2	0	1
Lazio	7	4	9	2
Lombardia	4	3	4	2
Marche	27	13	22	7
Molise	5	2	0	0
Piemonte	2	5	1	0
Sicilia	2	3	4	0
Toscana	4	4	7	0
Umbria	0	1	5	1
Veneto	3	3	10	0
TOTALE	127	97	145	40

Tabella 2. Distribuzione temporale dei genotipi di IBV (periodo 2007-2009).

	2007	%sul totale	2008	%sul totale	2009	%sul totale	2010	% sul totale
793B	79	62,2	65	71,1	98	67,6	19	47,5
M41	8	6,3	11	11,3	21	14,5	3	7,5
QX	19	15,0	13	13,4	17	11,7	10	25,0
IT-02	21	16,5	8	4,2	7	4,8	6	15,0
D274	0	0,0	0	0,0	2	1,4	1	2,5
B1648	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,5
TOTALE	127		97		145		40	

Tabella 3. Distribuzione dei genotipi 793B e M41 di IBV in funzione della tipologia produttiva (periodo 2007-2009).

	793B			M41		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
Broilers	39	27	45	2	3	5
Pollastre	6	7	9	3	1	1
Ovaiole da consumo	15	12	19	1	2	1
Riproduttori	4	8	8	0	0	5
Svezinatori	0	2	0	0	2	1
Polli colorati	6	7	13	0	2	5
Galletti	1	1	3	0	0	3
Capponi	1	0	0	0	1	0
Fagiani	6	1	0	2	0	0
Faraone	1	0	0	0	0	0

Tabella 4. Distribuzione dei genotipi QX, IT-02 e D274 di IBV in funzione della tipologia produttiva (periodo 2007-2009).

	QX			IT-02			D274		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009	2007	2008	2009
Broilers	8	4	6	14	4	7	0	0	2
Pollastre	1	3	1	3	1	0	0	0	0
Ovaiole da consumo	3	1	4	1	1	0	0	0	0
Riproduttori	1	0	2	0	0	0	0	0	0
Svezinatori	0	4	0	2	0	0	0	0	0
Polli colorati	4	1	3	0	1	0	0	0	0
Galletti	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Capponi	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fagiani	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Faraone	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 5. Distribuzione % dei genotipi di IBV nel broiler (periodo 2007-2009).

Genotipo	2007	2008	2009
793B	61,9	71,1	71,0
M41	3,2	7,9	7,3
QX	12,7	10,5	8,7
IT-02	22,2	10,5	10,1
D274	0,0	0,0	2,9

Tabella 6. Distribuzione % dei genotipi di IBV nelle pollastre (periodo 2007-2009).

Genotipo	2007	2008	2009
793B	46,1	58,3	81,8
M41	23,1	8,4	9,1
QX	7,7	25,0	9,1
IT-02	23,1	8,3	0,0
D274	0,0	0,0	0,0

Tabella 7. Distribuzione % dei genotipi di IBV nelle galline ovaiole da consumo (periodo 2007-2009).

Genotipo	2007	2008	2009
793B	75,0	75,0	79,2
M41	5,0	12,5	4,2
QX	15,0	6,3	16,6
IT-02	5,0	6,2	0,0
D274	0,0	0,0	0,0

Tabella 8. casi di infezione da genotipo QX nel 2007.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Abruzzo	Broilers	Respiratorio+renale
Basilicata	Polli colorati	Respiratorio
Campania	Polli colorati	Renale
Emilia Romagna	Broilers	Renale
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Riproduttori	Respiratorio
Emilia Romagna	Fagiani	Respiratorio+renale
Emilia Romagna	Capponi	Respiratorio
Lazio	Polli colorati	Respiratorio
Lazio	Polli colorati	Respiratorio
Marche	Broilers	Respiratorio
Marche	Broilers	Respiratorio
Marche	Broilers	Renale
Marche	Broilers	Renale

Tabella 9. Casi di infezione da genotipo QX nel 2008.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Abruzzo	Svezzatore	Respiratorio
Abruzzo	Svezzatore	Renale
Abruzzo	Svezzatore	Difformità di sviluppo
Basilicata	Polli colorati	Respiratorio
Campania	Svezzatore	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Pollastre	Respiratorio
Lombardia	Broilers	Respiratorio+renale
Piemonte	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Sicilia	Broilers	Renale

Tabella 10. casi di infezione da genotipo QX nel 2009.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Calabria	Polli colorati	Respiratorio
Campania	Polli colorati	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Respiratorio
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Fagiani	Renale
Emilia Romagna	Polli colorati	Respiratorio
Lombardia	Broilers	Renale
Marche	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Marche	Galline ovaiole da consumo	Apparato riproduttore
Marche	Riproduttori	Respiratorio
Marche	Riproduttori	Respiratorio
Piemonte	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Veneto	Broilers	Respiratorio

Tabella 11. Casi di infezione da genotipo QX nel 2010.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Campania	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio + Apparato riproduttore
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio + renale
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio + Apparato riproduttore ("false ovaiole")
Emilia Romagna	Riproduttori	Apparato riproduttore
Emilia Romagna	Polli colorati	Respiratorio + renale
Marche	Polli colorati	Respiratorio+renale
Umbria	Riproduttori	Respiratorio