

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA: AGGIORNAMENTO SUI DATI RACCOLTI NEL CORSO DELL'ANNO 2010

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

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Forlì, Via Marchini, 1 - 47100 Forlì.*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Reparto di Genomica - Sede di Brescia, via Bianchi, 9 - 25124 Brescia.*

Summary

The molecular characterization of infectious bronchitis virus detected in Italy during 2010 is reported. Identification of IBV was performed by RT-PCR followed by partial sequencing of the hypervariable region of the S1 gene. 213 IBV isolates were characterized. 793B confirmed to be the dominant genotype (49.8%). The second most common genotype resulted QX (29.6%), followed by Massachusetts (12.2%) and It02 (5.6%). Genotypes B1648, D274 and 624/I were also rarely detected.

INTRODUZIONE

Il virus della Bronchite Infettiva Aviaria (IBV) è un coronavirus, prototipo della famiglia Coronaviridae, con genoma RNA a singolo filamento e provvisto d'envelope. E' causa della bronchite infettiva aviaria, patologia largamente diffusa e responsabile di elevate perdite economiche nell'allevamento intensivo del pollo. Si tratta di una 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. Il genoma del virus codifica per 4 proteine strutturali: la glicoproteina spike (S), il Nucleocapside (N), la glicoproteina di membrana (M) e la proteina dell'envelope (E). La proteina S, ed in particolare il frammento S1, è la parte più esposta del virus che interviene nell'attacco alla cellula ospite, comprende la maggior parte dei determinanti antigenici ed è pertanto responsabile della formazione di nuove varianti. Nel corso degli anni sono state innumerevoli le varianti isolate in campo, differenti fra loro dal punto di vista sierologico, genotipico e patogenetico. Attualmente sono stati descritti più di 50 sierotipi e si assiste alla periodica comparsa di nuovi. 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.

Questo studio si prefigge di caratterizzare a livello molecolare i ceppi di IBV attualmente circolanti sul territorio nazionale, mediante analisi di RT-PCR e successivo sequenziamento di una parte della regione ipervariabile del gene S1.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Questo studio è stato effettuato sui campioni conferiti presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I campioni conferiti comprendono animali vivi con segni clinici, 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.

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 fornita dalla ditta produttrice. La reazione di RT-PCR, è stata 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 sono state 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, l'amplificato ottenuto è stato sottoposto a sequenziamento. 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, impiegando la stessa coppia di primers utilizzata nell'amplificazione. Le reazioni di sequenza sono state 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).

RISULTATI

Nel corso dell'anno 2010 sono stati analizzati 611 campioni per la ricerca di IBV, composti da 196 tamponi e 415 carcasse. 281 campioni sono risultati positivi alla RT-PCR e sottoposti a successivo sequenziamento. Di questi, sono stati esclusi dall'analisi tutti quelli che rientravano nei seguenti casi:

- Campioni risultati positivi provenienti da gruppi vaccinati da almeno tre settimane nei confronti del ceppo di IBV riscontrato. Il limite di tre settimane è stato posto sulla base dei dati disponibili in letteratura sulla persistenza dei ceppi vaccinali di IBV (5).
- Campioni positivi provenienti da un allevamento in cui era già stato identificato il genotipo di IBV rilevato.

I dati così elaborati comprendono 213 campioni provenienti da 164 allevamenti localizzati in 16 regioni italiane.

Nella tabella 1 sono riassunte le identificazioni molecolari effettuate, suddivise per genotipo. Sono stati identificati 7 differenti genotipi circolanti sul territorio nazionale

(793B, QX, It02, Massachusetts, D274, B1648 e 624/I).

Nella tabella 2 i genotipi identificati sono suddivisi per distribuzione geografica e nella tabella 3 per tipologia produttiva (ovaiole, riproduttori boiler e pollastre).

Nella tabella 4 è stato riportato il tropismo tissutale dei ceppi analizzati, registrato in sede autoptica o, nel caso dei tamponi, sulla base della valutazione dei dati riportati dal conferente.

DISCUSSIONE

In questo lavoro sono riportati i dati raccolti sul materiale diagnostico conferito nell'anno 2010 presso la Sezione Diagnostica di Forlì. I ceppi analizzati provengono da 16 regioni italiane, anche se con differente apporto numerico: la maggioranza dei ceppi analizzati provengono, infatti, dall'Emilia Romagna. La caratterizzazione molecolare di 213 ceppi di IBV ha permesso di rilevare 7 genotipi differenti circolanti sul territorio nazionale con percentuali variabili: 49.8% per il genotipo 793B, 29.6% per il QX, 12.2% per il Massachusetts, 5.6% per l'It02, 1,9% per il 624/I, e 0.5% per i genotipi B1648 e D274.

In accordo con quanto riportato precedentemente (6, 8), il genotipo 793B resta il genotipo a maggiore diffusione, essendo stato rilevato nel 49.8% dei campioni positivi analizzati, principalmente associato a forme respiratorie nel boiler. 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 (3) e in Italia a partire dal 2005 (1), conferma l'aumento della sua diffusione, risultando il secondo genotipo per identificazione. La percentuale di identificazione (29.6%) è risultata, infatti, in netto aumento rispetto al 2009 (11.7%) (8) lo ritroviamo in 11 delle 16 regioni campionate, in particolare in pollastre ed ovaiole associato sia a forme respiratorie che riproduttive.

Il genotipo Massachusetts, molto diffuso in tutta Europa (9) è stato identificato nel 12.2% degli isolati analizzati, distribuito in maniera regolare tra le differenti tipologie produttive e maggiormente associato a forme respiratorie.

Il genotipo It02, isolato per la prima volta in Italia nel 1999, (2) nel corso dell'ultimo decennio era arrivato a notevole diffusione (30.5% tra il 2005 ed il 2007) (6). La sua identificazione nel 5.6% dei campioni positivi, conferma una diminuzione della circolazione di questo genotipo, in accordo con quanto riportato precedentemente (8). Il genotipo It02 è stato isolato prevalentemente da allevamenti di galline ovaiole, maggiormente associato a forme respiratorie.

Il genotipo 624/I, diffuso in Italia tra gli anni '60 e '90, aveva drasticamente diminuito la sua diffusione fino alla sua ultima registrazione nel 2004 (6). Ne registriamo l'identificazione in 3 allevamenti di broiler dell'Emilia Romagna ed 1 del Lazio, in tutti casi associato a forme respiratorie.

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 già stato identificato in Italia alla fine del 2009. Durante il 2010 è stato rilevato in Emilia Romagna in pollastre di 60 giorni di età con sindrome respiratoria.

Registriamo anche la ricomparsa del genotipo B1648, identificato all'inizio del 2010

in un allevamento nella provincia di Viterbo, in un gruppo di pollastre colpite, attorno ai 90 giorni di età, da una sindrome respiratoria.

Nonostante il tentativo di raccogliere più informazioni possibili riguardo lo stato vaccinale degli animali analizzati, in molti casi le informazioni non sono risultate complete. A questo proposito, siccome il metodo molecolare utilizzato non è in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo, i dati sono stati rielaborati escludendo dall'analisi tutti i ceppi con il 100% di omologia con i ceppi vaccinali più utilizzati (4/91, IB88, H120). Le percentuali di identificazione così rielaborate sono riportate in tabella 5. Circa il 50% dei ceppi di 793B identificati sono risultati del tutto omologhi al ceppo vaccinale, mentre nessun ceppo Massachusetts è risultato identico al ceppo H120. 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.

E' molto interessante notare che, quando tutti i ceppi con omologia del 100% con i ceppi vaccinali inclusi nell'analisi vengono rimossi dall'elaborazione, il genotipo QX diventa quello maggiormente diffuso (40.1%), in accordo con quanto riportato in Germania, Olanda e Belgio negli anni 2002-2006 (9).

Nella figura 1 sono riportati gli alberi filogenetici costruiti con il metodo neighbour-joining che raccolgono le sequenze analizzate suddivise per genotipo, insieme ai ceppi di riferimento. L'analisi è stata effettuata utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011). Come emerge dall'analisi, i ceppi It02 e Massachusetts mostrano alta omologia di sequenza mentre due ceppi del genotipo QX (205423 e 220886) e due ceppi del genotipo 793B (30360 e 301182) si discostano notevolmente da tutti gli altri ceppi analizzati. Questi ceppi mostrano una omologia di sequenza con i ceppi di riferimento in tutti i casi minore del 92%. Mutazioni non silenti sono state rilevate nella regione ipervariabile del gene S1 sottoposta a sequenziamento, in tutti i 4 ceppi.

Indagini più approfondite sono attualmente in corso su questi isolati.

CONCLUSIONI

Sulla base dei dati raccolti nel corso del 2010 la prevalenza dei genotipi di IBV nel territorio appare diversificata. Sono stati identificati 7 diversi genotipi circolanti: 793B, QX, Massachusetts, It02, 624/I, B1648 e D274. Il genotipo 793B resta quello maggiormente diffuso, anche se il metodo di analisi utilizzato, non differenziando tra i ceppi vaccinali e quelli di campo potrebbe aver sovrastimato la diffusione di questo genotipo ampiamente utilizzato come vaccino vivo attenuato. Il genotipo QX si conferma in ampia diffusione, mentre si assiste alla sia pur sporadica ricomparsa dei genotipi 624/I e B1648.

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. Moreno A., Fallacara F., Tosi G., and Massi P. (2007). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della bronchite infettiva aviare isolati in Italia tra il 2005-2007. *Atti II Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria, ISTISAN congressi, Bologna 7-8 Giugno 2007.* -p 55.
 7. 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).
 8. Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Fiorentini L., Massi P. 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.
 9. 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.

Tabella 1. Distribuzione genotipica dei ceppi di IBV analizzati.

	Genotipo						
	793B	624/I	B1648	D274	It02	Massachusetts	QX
Numero isolati (%)	106 (49.8)	4 (1.9)	1 (0,5)	1 (0.5)	12 (5.6)	26 (12.2)	63 (29.6)

Tabella 2. Distribuzione geografica dei ceppi di IBV inclusi nell'analisi.

Regione	793B	QX	Massachusetts	It02	D274	B1648	624/I	N° isolati
Abruzzo	1	2						3
Calabria	3		4	1				8
Campania	3	2	1					6
Emilia Romagna	56	34	16	3	1		3	113
Friuli				1				1
Lazio	5	2				1	1	9
Lombardia	3	5		1				9
Marche	16	6	3	3				28
Molise	2							2
Piemonte		3	1					4
Puglia		1						1
Sicilia	1	1						2
Toscana	4	2						6
Trentino				1				1
Umbria	1							1
Veneto	11	5	1	2				19

Tabella 3. Distribuzione dei diversi genotipi suddivisi per tipologia produttiva.

Genotipo						
	793B (%)	QX (%)	Mass (%)	It02 (%)	D274 (%)	B1648 (%)
Boiler	44 (41.5)	12 (19.0)	8 (30.8)	1 (1.4)	/	4 (100) /
Pollastra	28 (26.4)	19 (30.2)	10 (38.5)	/	1 (100)	/ 1 (100)
Ovaiola	26 (24.5)	26 (41.3)	6 (23.1)	9 (75.0)	/	/ /
Riproduttori	8 (7.5)	6 (9.5)	2 (7.7)	2 (16.7)	/	/ /

Tabella 4. Tropismo tissutale dei genotipi.

	Genotipo					
	793B	QX	Massachusetts	It02	D274	624/I
Respiratorio	42	16	11	6	1	4
Renale	2	3	3	/	/	/
Riproduttore	1	6	1	/	/	/
Resp+ riprod	1	/	/	/	/	/
Resp+ renale	1	2	1	/	/	/

Tabella 5. Distribuzione dei diversi genotipi escludendo dall'analisi i ceppi con omologia del 100% con le sequenze vaccinali.

	Genotipo					
	793B	624/I	B1648	D274	It02	Massachusetts Qx
Numero isolati (%)	50 (31.8)	4 (2.5)	1 (0,6)	1 (0.6)	12 (7,6)	26 (15.4) 63 (40.1)

