

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE ISOLATI IN ITALIA TRA IL 1963 ED IL 1989

Taddei R.¹, Tosi G.¹, Boniotti M.B.², Casadio M.¹, Fiorentini L.¹, Fabbi M.³, Massi P.¹

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.*

³ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 59/61- 27100 Pavia.*

Summary

A retrospective study was carried out on 123 Infectious Bronchitis Virus strains isolated in Italy between 1963 and 1989. A portion of the S1 gene was amplified and sequenced in order to explore the genetic variability of the IBV strains circulating in those years. Genotype Massachusetts was the prevalent genotype in the mid '60s, since then 624/I became the prevalent genotype until the end of the '80s. D1466 was first detected in 1979, D274 in 1981 and 793B in 1989. During the '60s and '70s the presence of some variant strains was also highlighted.

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 (BI), 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 tra le quali 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. Il sequenziamento nucleotidico e l'analisi genetica di questa regione forniscono un metodo veloce ed accurato per la genotipizzazione di IBV, oltre ad uno strumento efficace per lo studio dell'epidemiologia molecolare del virus.

Il sierotipo Massachusetts della BI è stato isolato per la prima volta in Europa negli anni '40 (Cavanagh & Davis, 1993) mentre Petek, Paparella & Catelani, e Galassi descrissero contemporaneamente la BI per la prima volta in Italia nel 1956.

L'andamento della malattia nel nostro paese, riguardo la prevalenza e la gravità, è stato fluttuante negli anni. Alla virosi primaria respiratoria inizialmente osservata, a partire dagli anni '60 si aggiunse la sindrome "nefrite/nefrosi" dovuta a ceppi nefropatogeni (Pascucci et al., 1990). A questo periodo risale infatti la prima segnalazione di un nuovo sierotipo in Italia: il ceppo nefropatogeno 1731PV (Rinaldi et al., 1966). Durante gli anni '70 la BI si è andata gradualmente attenuando, Zanella segnalava in quegli anni la notevole diffusione del ceppo nefropatogeno AZ23/74 (Zanella, 1976). All'inizio

degli anni '80 si assiste invece ad una sensibile ripresa della malattia e durante tutto il decennio si sono moltiplicati gli isolamenti di ceppi differenti, tra i quali il 3794/Fo/83 (Pascucci et al., 1986a) associato a gravi forme respiratorie, ed utilizzato anche nei prodotti vaccinali. Negli anni '80 sono state isolate con una certa frequenza le varianti tipizzate in Olanda: il ceppo D207 (anche conosciuto come D274) ed il D212 (meglio conosciuto come D1466). In particolare, il sierotipo D274 risultava essere anche il più diffuso in alcuni paesi dell'Europa occidentale all'inizio e alla metà degli anni '80 (Cook, 1984; Develaar et al., 1984).

Il genotipo 793/B fu identificato per la prima volta in Inghilterra nel 1990/91 (Gough et al., 1992; Parsons et al., 1992), ma la sua presenza è stata retrospettivamente dimostrata in Francia a partire dal 1985 (Cavanagh et al., 1998), mentre nei primi anni '90 fu isolato anche in Messico e Thailandia (Cook et al., 1996).

Il sierotipo 624/I fu inizialmente descritto nel 1993 associato a forma respiratoria nel broiler (Capua et al., 1994), la successivamente caratterizzazione molecolare ha confermato che si trattava un nuovo genotipo (Capua et al., 1999). Questo lavoro rappresenta uno studio retrospettivo sui ceppi circolanti sul nostro territorio negli anni '60, '70 e '80, per comprendere meglio e per la prima volta in maniera così estesa, la variabilità genetica della popolazione di IBV presente di quegli anni.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel presente studio sono stati inclusi 123 ceppi di IBV isolati mediante inoculo di uova SPF presso le sezioni diagnostiche di Forlì e Pavia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna tra gli anni 1963 e 1989 e conservati sottoforma di liofilizzato o di liquido allantoideo stoccato a -80°C.

In tabella 1 sono riportati i ceppi inclusi nell'analisi suddivisi per anno di isolamento. Dei 123 ceppi compresi nell'analisi 37 sono stati isolati da episodi di nefrite-nefrosi.

Anno isolamento	Numero ceppi analizzati	Ceppi nefropatogeni	Anno isolamento	Numero ceppi analizzati	Ceppi nefropatogeni
1963	4	0	1977	1	1
1964	2	0	1978	1	1
1965	2	0	1979	4	0
1966	9	0	1980	3	2
1967	13	1	1981	4	0
1968	1	0	1982	6	0
1969	6	3	1983	15	4
1970	4	1	1984	5	3
1971	1	0	1985	6	4
1972	2	0	1986	3	2
1973	2	2	1987	6	3
1974	3	0	1988	6	3
1975	3	1	1989	8	4
1976	3	2	TOTALE	123	37

Tabella 1. Ceppi di IBV inclusi nell'analisi suddivisi per anno di isolamento. Per ogni anno di isolamento viene anche riportato il numero di ceppi nefropatogeni analizzati.

Caratterizzazione molecolare di IBV

L'RNA totale è stato estratto dal liquido allantoideo o dal liofilizzato ricostituito in tampone PBS, utilizzando il kit di estrazione RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornita dalla ditta produttrice. L'RNA così estratto è stato sottoposto a due reazioni di RT-PCR:

- Reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-; tabella 2), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (Cavanagh et al., 1999) del virus. In particolare, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®), in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 600nM di ogni primer 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)
- Reazione con i primer D2- e D1+ (Tabella 2) specifici per il genotipo D1466 (Cavanagh et al., 1999) che differisce per circa il 50% della sequenza S1 da tutti gli altri genotipi. La PCR è stata eseguita con medesime concentrazioni della mix di reazione e con lo stesso profilo di amplificazione della PCR con i primer universali.

Primer	Sequenza	Posizione in S1
XCE2-	CTCTATAAACACCCTTACA	1168 to 1193
XCE1+	CACTGGTAATTTTTCAGATGG	728 to 749
D2-	ATATGCCAAAACATCAGTG	636 to 654
D1+	AGAGTGCTATATCTTTTGTT	233 to 252

Tabella 2. Sequenza e posizione di annealing dei primer utilizzati in RT-PCR.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

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, in entrambe le direzioni ed 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).

L'analisi filogenetica è stata eseguita su tutti gli amplificati ottenuti mediante primer universali, con metodo Neighbour-joining utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011). Il valore di bootstrap considerato nell'analisi, per associare un valore di affidabilità ai rami dell'albero, è di 1000 replicati.

Le sequenze di genotipi di riferimento o di ceppi varianti circolanti negli anni inclusi nell'analisi sono: 624/I (JQ901492), 3794/83 FO; AZ23/74; 1731/65PV; D274 (X15832); 793B (AF093794); H120 (M21970); M41 (AY561712); PA/1220/ (AY789942).

RISULTATI

Dei 123 ceppi in analisi, 122 ceppi sono stati amplificati mediante RT-PCR con primer universali mentre 1 ceppo isolato nel 1979 è stato amplificato con primer specifici per il genotipo D1466. Tale amplificato, sottoposto a sequenziamento, è stato confermato appartenere al genotipo D1466 con similarità nucleotidica del 98% con il ceppo di riferimento (Accession Number: M211971).

L'analisi filogenetica mediante metodo neighbour joining è stata condotta sui 122 amplificati di 382 bp ottenuti con primer universali per il gene S1 di IBV.

Le sequenze si raggruppano in 8 differenti cluster, 4 dei quali corrispondenti ai genotipi circolanti durante gli anni in analisi (Figura 1): 624/I, 793B, D274, Massachusetts.

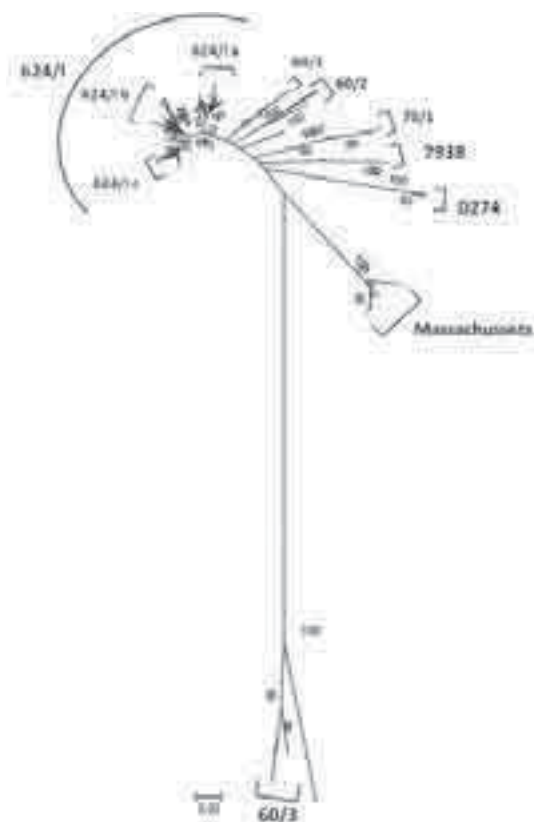


Figura 1. Albero filogenetico costruito con il metodo neighbour-joining analizzando tutte le sequenze nucleotidiche parziali del gene S1 ottenute con i primer universali.

Separati rispetto a questi, vi sono altri 4 cluster qui denominati: 60/1, 60/2, 60/3, 70/1, che complessivamente raggruppano 15 ceppi. Tutti i 15 ceppi appartenenti a questi cluster mostrano identità nucleotidica con i ceppi di riferimento, o con le varianti utilizzate nel lavoro tra 61.8 e 89.5% mentre l'identità nucleotidica con le

sequenze depositate in GenBank non supera in nessun caso il 90% (82-90%).

Il genotipo 624/I è il cluster in assoluto più numeroso che raccoglie 76 dei 123 ceppi in analisi. Il cluster è suddiviso in 3 sottocluster 624/I a, 624/I b, 624/I c, che sono in correlazione con l'anno di isolamento: 1965-1978, 1975-1988; 1981-1989 rispettivamente.

Il genotipo Massachussets comprende 26 ceppi isolati durante tutto il periodo in analisi. Di questi 5 ceppi mostrano un'identità del 100% con il ceppo vaccinale H120, largamente utilizzato in quegli anni.

Due ceppi, entrambi isolati nel 1989 clusterizzano con il genotipo 793B, mostrando un'identità nucleotidica del 98,4 e 97,6% con la sequenza di riferimento.

Il cluster D274 comprende 4 ceppi isolati tra il 1981 ed il 1983 con identità di sequenza con il ceppo di riferimento compresa tra il 93,5 ed il 100%.

Dei 4 cluster separati dai genotipi di riferimento, 3 risultano correlati maggiormente al cluster 624/I, con una identità di sequenza rispetto ai genotipi di riferimento o le varianti incluse nell'analisi nella regione considerata che va dal 89-89,3% per il gruppo 60/1, 87,6-88% per il gruppo 60/2 e 85,5-88 per il gruppo 70/1.

Il cluster 60/3 risulta essere quello maggiormente distante filogeneticamente, i ceppi che vi appartengono sono tutti caratterizzati da un'inserzione di 3 aminoacidi in posizione 319-321. La maggiore identità con tutte le sequenze depositate in GenBank risulta essere del 82% con la variante americana PA/1220/1998, anche essa caratterizzata da una inserzione di 9 nt nella medesima posizione ma con un nt di differenza, risultante in una mutazione non sinonima (GATCTTTAT nelle sequenze analizzate nel lavoro e GATTCTTAT in PA/1220/1998).

I ceppi nefropatogeni analizzati appartenevano per la maggioranza (29 di 37) al genotipo 624/I, in particolare al gruppo 624/I b di cui fa parte anche la nota variante nefropatogena AZ23/74. Vale la pena notare che i due ceppi 793B identificati erano ceppi a tropismo renale mentre nessun ceppo nefropatogeno è risultato appartenere ai genotipi Massachussets e D274.

DISCUSSIONE

In questo studio sono stati analizzati 123 ceppi di IBV isolati negli anni 1963-1989. Tutti i ceppi sono stati amplificati e sequenziati in una regione parziale del gene codificante per la subunità S1 della proteina S di IBV. Tre regioni ipervariabili (HVR1, 2, 3) associate con gli epitopi neutralizzanti della subunità S1, sono state identificate e comprendono i residui aminoacidici 38-51, 99-115 e 274-387 rispettivamente (Koch et al., 1990). I primer universali utilizzati in questo studio amplificano la HVR3 mentre i primer specifici per il genotipo D1466 amplificano la regione HVR2. Da questo studio è emerso che il genotipo Massachussets era il genotipo predominante fino alla metà degli anni '60, dal quel momento in poi diventa predominante il 624/I e lo rimane fino alla fine degli anni '90 (Figura 3). Tra la fine degli anni 70 ed i successivi anni '80 sono anche stati isolati i genotipi D1466, D274 e 793B. Durante gli anni '60 e '70 è stata evidenziata la presenza di ceppi variati sul nostro territorio. La maggioranza dei ceppi analizzati clusterizzano con il genotipo 624/I, genotipo identificato e caratterizzato solo successivamente rispetto all'anno di isolamento dei ceppi in analisi in questo lavoro (Capua et al., 1994; Capua et al., 1999), ma presente in maniera massiccia già dall'inizio degli anni '60. Il cluster 624/I può essere suddiviso in 3 differenti sottocluster (624/I a, 624/I b,

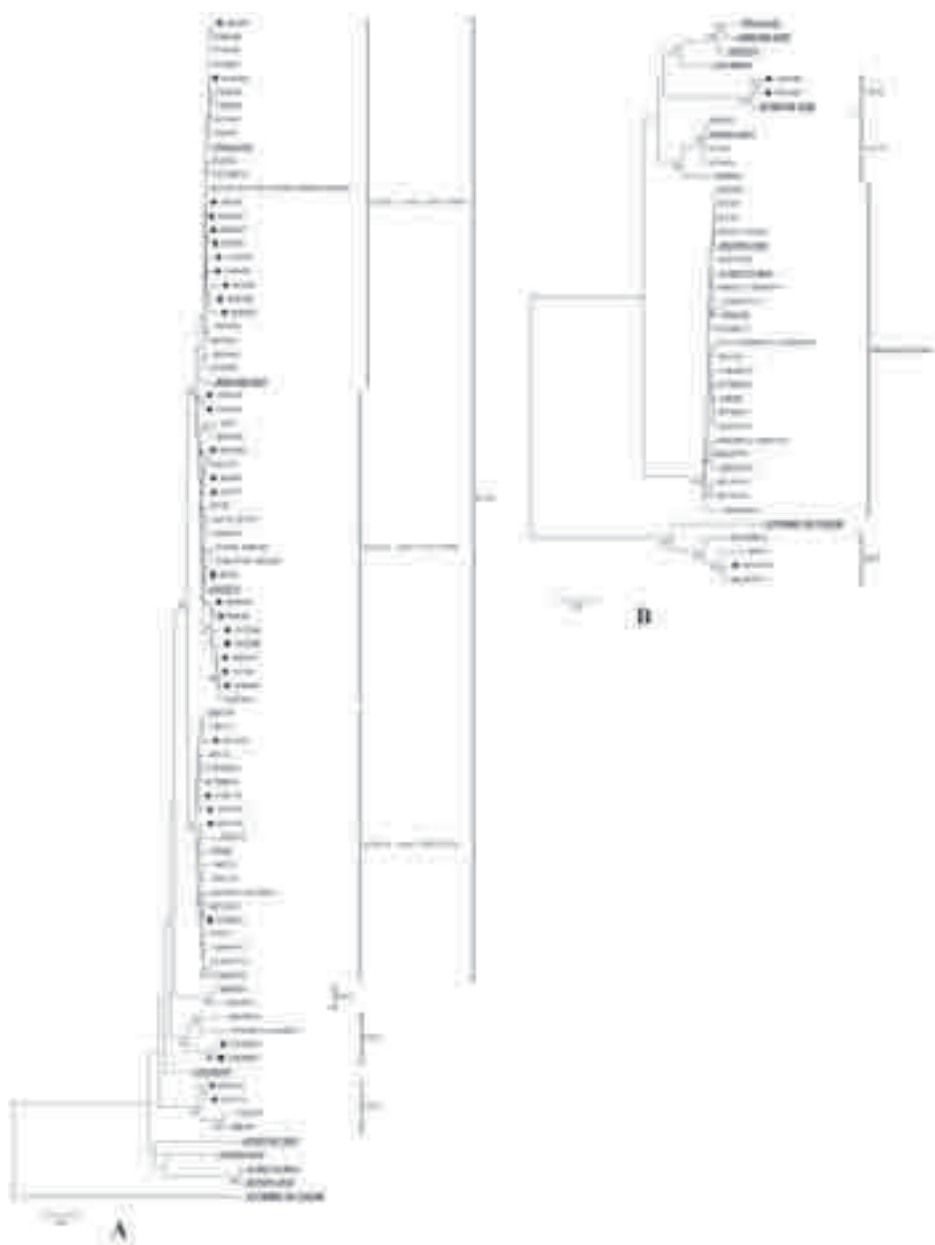


Figura 2. Alberi filogenetici costruiti analizzando le sequenze nucleotidiche parziali del gene S1 con il metodo neighbour-joining. I ceppi di riferimento e le varianti incluse nell'analisi sono in grassetto corsivo sottolineato. Tutti i ceppi nefropatogeni sono indicati con un rombo nero. Sono riportati solamente i valori di bootstrap >70. **A.** Genotipo 624/I e cluster 60/1, 60/2, 70/1. **B.** Genotipi 793B, D274, Massachussets e cluster 60/3.

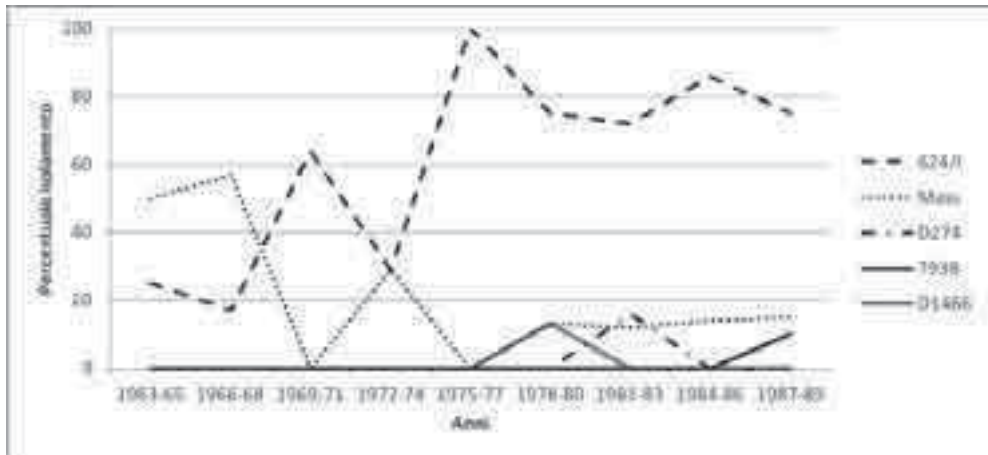


Figura 3. Andamento della percentuale di isolamento dei genotipi 624/I, Massachussets, D274, 793/B e D1466.

624/I c). Risulta infatti che le sequenze dei ceppi isolati negli anni 1965-1978 differiscono da quelle isolate negli anni 1975-1988 e da quelle isolate tra gli anni 1981-1989 formando così 3 gruppi chiaramente separati, ad indicare una variazione del genotipo negli anni. I ceppi varianti caratterizzati da Zanella e Pascucci AZ23/74 e 3794/83FO appartengono al secondo ed al terzo cluster rispettivamente, mentre il ceppo di riferimento del genotipo 624/I appartiene al terzo gruppo. Tale dato è in accordo con gli isolamenti del ceppo nefropatogeno AZ23/74 già segnalati per i 25 anni successivi alla sua descrizione, associati a gravi perdite, in particolare all'allevamento dei broilers (Zanella et al., 2003)

Due ceppi appartenenti al genotipo 624/I (37/1969 FO e 307/69FO), ed in particolare al sottocluster 624/i-a, erano stati precedentemente analizzati nelle loro caratteristiche antigeniche (Rinaldi et al., 1970) ed erano risultati tra loro simili ma non correlabili a sierotipi classici utilizzati per l'analisi effettuata al tempo (Massachussets, Connecticut, Iowa, Holte, Gray, JMK, Australia T, IBV-10, IBV – K4), dato che conferma la nostra caratterizzazione genotipica.

Tre cluster, qui nominati 60/1, 60/2 e 70/1, insieme alla variante 1731/65PV si separano dal cluster 624/I. L'identità nucleotidica tra i ceppi ad essi appartenenti ed il genotipo 624/i è compresa nel range 82,6-88,2%, del tutto paragonabile all'identità di sequenza rilevata nella medesima zona sequenziata anche tra ceppi di riferimento di genotipi differenti: il ceppo 793/B condivide l'89,3% di identità con IT02 e l'86,9% con il genotipo B1648 nelle 382bp analizzate. Tutti i ceppi dei primi due cluster sono stati isolati durante gli anni '60, mentre tutti quelli del terzo sono stati isolati negli anni '70. La separazione genotipica è confermata, anche in questo caso dall'analisi antigenica di due ceppi (215/1969 PV e 216/1969 PV), risultati appartenere al cluster 60/2. Questi due ceppi erano anch'essi già stati studiati da Rinaldi et al., (1970) e risultati simili tra loro, non correlabili a sierotipi classici e differenti anche dai ceppi 37/1969 FO e 307/69FOP. Anche in questo caso, quindi il

dato genotipico da noi ottenuto rispecchia le caratteristiche dei ceppi anche dal punto di vista antigenico.

Anche il ceppo variante 1731/65PV risulta antigenicamente differente dai ceppi AZ23/74 e 3794/83FO, mentre risulta interessante notare che il ceppo 3794/83FO viene neutralizzato completamente dall'antisiero del ceppo nefropatogeno AZ23/74 (Zanella, 1976), anche se l'antisiero 3794/83FO non neutralizza il ceppo AZ23 con titolo significativo, dato da sottoporre ad approfondimento (Pascucci et al., 1986a). Il genotipo Massachussets è quello, insieme al 624/I che viene isolato durante tutto il corso del periodo in esame. Bisogna ricordare che negli anni '60 vi fu applicazione generalizzata della vaccinazione con sierotipo Massachussets e che 5 ceppi isolati negli anni '80 sono risultati 100% identici al ceppo vaccinale H120, largamente utilizzato in quegli anni (Pascucci et al., 1986a).

Il genotipo D1466 viene evidenziato per la prima volta nel 1979 mentre il genotipo D274 è stato rilevato nel 1981 e viene rilevato solo fino al 1983. Entrambe le date sono precedenti alle prime segnalazioni presenti in bibliografia. Probabilmente, infatti, questi genotipi rimangono presenti a basse percentuali negli anni seguenti, come descritto da Pascucci et al. 1986b, che riportava i primi isolamenti dei due ceppi nel 1985 e che osservava però come la sieroconversione verso queste varianti fosse in quegli anni estremamente diffusa negli allevamenti.

Il nostro risulta anche il primo rilevamento del genotipo 793/B in Italia, che diventa uno dei maggiori componenti della popolazione di IBV nel nostro paese durante gli anni '90 (Capua et al., 1999). I due ceppi isolati nel 1989 hanno mostrato un'identità nucleotidica del 98,4 e 97,6 con la sequenza 793/B di riferimento ed in entrambi i casi, un tropismo renale.

Il cluster 60/3 è quello che in assoluto si discosta maggiormente da tutti gli altri. Il ceppo 187/1967 PV che vi appartiene era stato precedentemente analizzato (Rinaldi et al., 1970). In quello studio, gli autori conclusero che si trattava di un ceppo di incerta classificazione, pur essendo stato isolato da episodio di nefrite-nefrosi, in quanto presentava caratteristiche diverse dai virus di IBV fino ad allora considerati: più elevata sensibilità a pH acido e maggiore termoresistenza con stabilizzazione in presenza di cationi bivalenti, mentre l'infezione sperimentale di pulcini SPF aveva prodotto solo una lieve sintomatologia respiratoria. Queste caratteristiche fanno concludere agli autori che il ceppo meritava ulteriori approfondimenti, dal nostro studio emerge che tutti i ceppi appartenenti a questo cluster mostrano come maggiore caratteristica distintiva, una inserzione di 3 aminoacidi nella subunità S1.

Il genotipo 624/I presenta il 38% di ceppi nefropatogeni al suo interno, non sono presenti ceppi nefropatogeni tra quelli di genotipo Massachussets e 624/I, mentre entrambi i ceppi 793B presentano tropismo renale.

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato evidenziato come durante gli anni in analisi i genotipi Massachussets e 624/I fossero i più diffusi. In particolare il genotipo Massachussets risulta il genotipo isolato con maggiore frequenza fino alla metà degli anni '60, mentre negli anni successivi è il genotipo 624/I quello che appare a maggiore diffusione. L'analisi molecolare ha anche permesso di evidenziare come questo genotipo abbia subito modificazione nel corso del periodo temporale analizzato. Sono poi stati isolati i genotipi D1466, D274 e 793B negli anni 1979, 1981 e

1989, rispettivamente. In tutti casi la presenza di questi genotipi è stata dimostrata antecedente alle segnalazioni presenti in bibliografia. E' stata poi dimostrata la presenza negli anni '60 e '70 di diverse varianti genotipiche alcune delle quali già classificate come varianti antigeniche negli anni in cui erano state isolate.

BIBLIOGRAFIA

1. Cook JK. 1984. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol.*;13(4):733-41.
2. Cook JK, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB. 1996. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). *Vet Rec.*;138(8):178-80.
3. Cavanagh D, Davis PJ. 1993. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960s in the U.K. *Arch Virol.* 130(3-4):471-6.
4. Cavanagh D., Mawditt K., Gough R., Picault J.P. Britton P. 1998. Sequence analysis of strains of the 793/B genotype (CR88, 4/91) of IBV isolate between 1985 and 1997. In E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.) *Proceedings of an International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infectious in Poultry* (pp. 252-256). Giessen: Justus Liebig University.
5. 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.
6. Capua I, Gough RE, Mancini M, Casaccia C, Weiss C. 1994. A 'novel' infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. *Zentralbl Veterinarmed B.* 41(2):83-9.
7. Capua I., Z. Minta, E. Karpinska, Karen Mawditt, P. Britton, D. Cavanagh & R. E. Gough. 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian pathol.*: 28, 587-592.
8. Develaar F.G., Kouwenhoven B., Burger A.G. 1984. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler productions in The Netherlands. *The Veterinary Quaterly*, 6:114-120.
9. Gough RE, Randall CJ, Dagless M, Alexander DJ, Cox WJ, Pearson D. A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet Rec.*;130(22):493-4.
10. Koch G, Hartog L, Kant A, van Roozelaar DJ. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J Gen Virol.*; 71:1929-35.
11. Parsons D, Ellis MM, Cavanagh D, Cook JK. 1992. Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Vet Rec.*;131(18):408-11.

12. Pascucci S., Cordioli P., Giovannetti L. 1986a. Caratterizzazione di un ceppo variante della bronchite infettiva. *La Clinica Veterinaria*, 109 (1):55-58.
13. Pascucci S., Cordioli P., Giovannetti L., Franciosi C. 1986b. Studi sierologici su ceppi del virus della bronchite infettiva isolati in Italia negli anni 1984-1985. *La Clinica veterinaria* 109 (1): 59-61
14. Pascucci S., Franciosi C., 1990. Epidemiologia della Bronchite Infettiva in Italia. *Zootecnica International*: 18-23.
15. Rinaldi A., Crespi A., Cervio G., Mandelli G. 1966. Isolamento di un ceppo nefropatogeno del IBV del pollo. *Selezione Veterinaria*, 7; 284-289.
16. Rinaldi A., Mandelli G., Pascucci S., Cervio G., Valeri A. 1970. Caratteristiche di alcuni virus isolati in Italia da malattie respiratorie del pollo. *Atti del IX° Convegno di patologia aviare*. Varese, 30 maggio - 2 giugno 1970.
17. 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. *Mol Biol Evol.*; 28(10):2731-9.
18. Zanella A. 1976. Bronchite Infettiva nei polli da carne con particolare riferimento alle forme di nefrite-nefrosi. *Atti XV Convegno di Patologia aviare*. Sirmione, 1976.
19. Zanella, A., Lavazza, A., Marchi, R., Moreno Martin, A. and Paganelli, F. 2003. Avian infectious bronchitis: characterization of new isolates from Italy. *Avian Diseases*, 47: 180–185.