

crociata. L'unica considerazione utile che scaturisce dai risultati sierologici rilevati è che la sola risposta anticorpale non è sufficiente a proteggere dall'infezione.

In conclusione le due prove sono state fortemente condizionate dal titolo infettante elevato utilizzato nel challenge, dalla lontananza delle vaccinazioni, dagli schemi vaccinali impostati dal Veterinario aziendale che non ha seguito le indicazioni dettate dalle case produttrici dei vaccini utilizzati che hanno visto combinare due dosi di vaccino vivo attentato con una dose di vaccino inattivato in un gruppo e due dosi di vaccino vivo attenuato con mezza dose di vaccino bivalente inattivato nel secondo gruppo. Si ricorda che per il vaccino inattivato utilizzato nel gruppo A la casa produttrice dichiara una protezione immunitaria fino a 56-60 settimane di età con la doppia vaccinazione a dose intera; per il vaccino inattivato utilizzato nel gruppo B la casa produttrice dichiara una protezione soddisfacente fino alla 17 settimana dopo la seconda vaccinazione. In particolare per il gruppo A si deve considerare che il vaccino inattivato bivalente è stato utilizzato a metà dose. Questo significa ridurre ulteriormente la capacità di prolungare nel tempo la risposta immunitaria specifica per *S. enteritidis* proprio come conseguenza di un'applicazione troppo distante da quanto indicato dalla casa produttrice dello stesso vaccino.

CONCLUSIONE

In conclusione si può affermare che non esistono molti lavori scientifici che valutano l'efficacia dell'applicazione di diverse combinazioni vaccinali per Salmonella e la loro capacità di prolungare così a lungo la risposta immunitaria specifica, come invece hanno dimostrato le due prove di challenge eseguite con ceppo di campo di *Salmonella enteritidis* con alto titolo infettante ed a così elevata distanza dalle vaccinazioni ed in un caso con l'uso un vaccino inattivato a metà dose.

BIBLIOGRAFIA

1. Arnold ME., Gosling RJ., La Ragione RM., Davies RH., Martelli F. 2014. Avian Pathol. Mar 24.
2. Barrow P.A. 1992. ELISAs and serological analysis of salmonella infections in poultry: a review. Epidemiol. Infect. 109, 361-369.
3. Okamura M., Tachizaki H., Kubo T., Kikuchi S., Suzuki A., Takehara K., Nakamura M. 2007. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. Vaccine 25, 4837-4844.
4. Penha Filho Ra., de Paiva JB., Arguello YM., da Silva MD., Gardin Y., Resende F., Berchieri Junior AB., Sesti L., 2009. Avian Pathol. 38(5):367-75.
5. Springer S., Lindner T., Ahrens M., Woitow G., Prandini F., Selbitz HJ. 2011. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 124(3-4):89-93.

CIRCOLAZIONE DI UN NUOVO GENOTIPO DI VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA

Moreno A.¹, Ceruti R.², Boniotti B.¹, Gavazzi L.², Fasoli P.³, Cordioli P.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, via Bianchi, 9 – 25124, Brescia

² Gesco Consorzio Coop., Via Bonfandina, 9 – Cazzago San Martino, Brescia

³ Avicola Alimentare Monteverde SRL, Via San donato, 107 – Rovato, Brescia

Summary

This study reported for the first time the circulation in Italy since 2012 of IBV strains closely related to IBV/Guandong/Xindadi/0903 isolated in China. The description of clinical forms, virus isolation, sequencing of S1 gene and phylogenetic and molecular analysis of four cases detected in the period 2012 - 2014 were here described. The phylogenetic analysis showed that the Italian and Chinese strains formed a clearly distinguishable group within the A2 genotype, which included the QX strain widely isolated in Europe and China. The major part of strains belonging to this genotype were nephropathogenic, however the group here described was associated with respiratory forms without renal involvement. The full-length S1 gene of two Italian strains was sequenced and along with other full-length IBV genomes available from GenBank, IBV/Guandong/Xindadi/0903 included, was analyzed for recombination. Evidence of recombination was found in the Italian and Chinese strains in the S1 protein being identified the QX and 4/91 sequences as major and minor parents. These results demonstrated the circulation of a new IBV variant closely related to IBV strains isolated in China probably originated as result of a recombination event between QX and 4/91 strains. Permanent monitoring of circulating strains would be advisable in order to rationally modify vaccination strategies to make them appropriate to the field situation.

INTRODUZIONE

La bronchite infettiva aviare, patologia a diffusione mondiale, causa ogni anno notevoli problemi sia sanitari che economici per il settore avicolo italiano. Le perdite economiche sono in parte dovute alla notevole variabilità antigenica dei ceppi virali coinvolti che, malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti con il ceppo classico M41 e con il ceppo 4/91 (793B), continuano a determinare la comparsa di forme cliniche. Anche il tropismo virale diviene sempre più variabile e si manifesta con differenti forme cliniche, dalle respiratorie o renali più frequenti nei broilers a quelle caratterizzate da calo di ovodeposizione ed alterazione della qualità del guscio tipiche di ovaiole e riproduttori. A partire del 1956 (3), si sono progressivamente identificati nuovi sierotipi o varianti di virus della bronchite infettiva aviare (IBV) nei vari continenti, isolati anche da polli vaccinati con il ceppo classico Massachusetts. A tutt'oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi e, tuttavia, si pensa che solo una piccola parte di quelli esistenti sia stata individuata. L'elevata variabilità del virus, classificato come gamma coronavirus, sarebbe riconducibile fondamentalmente

alle modificazioni che si verificano a carico di una sola proteina strutturale, la proteina S degli spikes, ed in particolare della S1, una delle due sub-unità che la compongono. La continua comparsa di nuove varianti antigeniche può però rendere problematica la realizzazione di adeguate profilassi immunizzanti e, per questo motivo, le indagini epidemiologiche indirizzate alla caratterizzazione dei ceppi IBV isolati in ogni territorio risultano di notevole importanza nella scelta di programmi vaccinali in grado di conferire una buona protezione. Lo scopo del presente lavoro è segnalare nel nostro paese la presenza dal 2012 di un nuovo genotipo correlato con il ceppo IBV/Guandong/Xindadi/0903 descritto per la prima volta in Cina (2) e di fornire dati sulle caratteristiche genomiche e le forme cliniche osservate.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati analizzati campioni di trachee di broilers con forme respiratorie prelevati da 1 allevamento rurale e 4 allevamenti industriali. In tutti i casi la sintomatologia clinica era esclusivamente respiratoria caratterizzata da dispnea, rantoli acuti, scolo nasale, anoressia ed aumento di mortalità.

Le caratteristiche dei campioni sono le seguenti:

1- campioni da un allevamento rurale sito nel comune di Montichiari (BS) prelevati nel 2012. L'esame anatomo-patologico rilevava presenza di tracheite fibrinosa e sinusite purulenta.

2- campioni provenienti da un allevamento di broilers sito nel comune di Verona prelevati in Dicembre 2013. La forma clinica è comparsa all'età di 22-23 gg e si è manifestata per 9 gg. con una mortalità finale del 9 % dovuta a complicazioni secondarie da metapneumovirus aviare. Le lesioni più evidenti erano tracheite e sinusite catarrale.

3- campioni provenienti da un allevamento industriale di broilers sito nel comune di Leno (BS) prelevati in gennaio 2014. La forma clinica è comparsa a 28 gg con infiammazione catarrale a livello di trachea e bronchi e sindrome della testa gonfia. La mortalità ha raggiunto il 10% in seguito a complicanze virali e batteriche.

4- campioni originati da un allevamento di broilers nel comune di Forlì (FC) prelevati in due momenti diversi, gennaio e febbraio 2014. Sintomi e lesioni si sono manifestati a 15-16 gg con problemi respiratori e presenza di essudato catarrale in trachea. La mortalità a fine episodio è risultata elevata (19%) a causa della presenza di *E. coli* setticemico.

Analisi filogenetica e molecolare e isolamento virale

L'RNA totale è stato estratto dal materiale patologico, utilizzando trizol reagent (Invitrogen, USA) come da istruzioni. L'RNA così estratto è stato sottoposto a reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (1) del virus, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®). Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state

analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 5 (5) utilizzando il metodo neighbour-joining, modello Tamura-Nei. Le topologie evidenziate sono state confermate con i metodi maximum likelihood e maximum parsimony.

Su due ceppi scelti isolati nel 2012 e 2014 è stato eseguito il sequenziamento completo del gene S1 utilizzando dei primer disegnati sulla base dell'allineamento delle sequenze dei ceppi di riferimento più simili. L'analisi molecolare delle sequenze aminoacidiche della proteina S1 completa è stato eseguito facendo un confronto con il ceppo prototipo M41.

Le sequenze nucleotidiche complete della S1 sono state sottoposte ad un'analisi di ricombinazione utilizzando il programma RDP3 (4) utilizzando i metodi RDP, BOOTSCAN, GENECONV e MAXCHI. Al fine di ottenere una stima conservativa, è stato accettato un evento di ricombinazione solo quando evidenziato da almeno tre metodi implementati nel programma d'analisi. In tutte le analisi la soglia di significatività statistica è stata posta a valori di $P=0.05$.

Per l'isolamento virale, i campioni sono stati in seguito inoculati in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo SPF di 9-11 gg di età. La crescita virale è stata confermata tramite RT-PCR e valutazione della comparsa di lesioni tipiche sugli embrioni di pollo.

RISULTATI

Isolamento Virale e identificazione di altri agenti respiratori

Gli esami virologici e batteriologici hanno rilevato la presenza dei seguenti ceppi:

1- ceppo IBV isolato dai campioni provenienti da polli rurali identificato come Italy/243746/2012. La ricerca di altri agenti eziologici ha rilevato la presenza di *Mannheimia haemolytica*.

2- ceppo originato dai campioni dell'allevamento di Verona codificato con il n. Italy/14810/2014. La ricerca di altri agenti respiratori ha rilevato la presenza di metapneumovirus aviare.

3- ceppo IBV Italy/8318/2014 isolato dall'allevamento di Leno. Dai campioni è stato inoltre identificato metapneumovirus aviare e *E. coli*.

4- dai campioni provenienti dall'allevamento di Forlì non è stato possibile isolare i ceppi IBV dopo tre passaggi su uova embrionate di pollo. L'esame batteriologico ha individuato un *E. coli* setticemico. Gli estratti originali risultati positivi alla RT-PCR per IBV sono stati codificati con i n. Italy/14847/2014 e Italy/42599/2014 rispettivamente per i campioni prelevati in gennaio e febbraio 2014.

Analisi filogenetica e molecolare

L'albero filogenetico è stato costruito sulle sequenze nucleotidiche della regione iper-variabile della S1 dei ceppi italiani di campo e dei ceppi di riferimento rappresentativi dei genotipi più rilevanti. L'analisi filogenetica ha rilevato la presenza di un cluster ben differenziato formato da i ceppi italiani altamente

correlati con un ceppo IBV isolato in Spagna nel 2012 ed il ceppo IBV/Guandong/Xindadi/0903 (XD3) descritto per la prima volta in Cina. Tale gruppo, anche se chiaramente distinguibile, forma parte di un genotipo descritto in Cina ed identificato come A2 type che raggruppa al suo interno i ceppi di riferimento A2 e QX. Gli altri genotipi identificati sono 4/91, M-41, IT02, 624-I/Q1, B1648, D274 e D1466 (figura n.1). I ceppi isolati nel 2014 presentano un'elevata percentuale di omologia tra di loro (99,7-100%) che è leggermente più bassa (96,1-96,3%) nei confronti del ceppo isolato nel 2012. L'analisi in BLAST ha evidenziato che la maggior percentuale di omologia dei ceppi italiani è verso il ceppo XD3 (95,5-95,8%) mentre che verso il ceppo QX e 4/91 è inferiore ma sopra l'89% (89,2-90,3% verso il QX e 89,2-89,8% verso il 4/91).

L'analisi filogenetica della S1 completa dei due ceppi scelti (Italy/243746/2012 e Italy/8318/2014) ha confermato la topologia evidenziata e la clusterizzazione all'interno del genotipo A2. L'analisi molecolare della sequenza aminoacidica della proteina S1 completa è stato eseguito comparando le sequenze italiane con quelle dei ceppi di riferimento. Questa analisi ha rilevato una delezione di 2 aminoacidi in posizione 21A, 21AA (numerazione M41) nel ceppo italiano del 2012 non riscontrata negli altri ceppi. Inoltre è stato evidenziato che la sequenza aminoacidica della S1 dei ceppi italiani e del ceppo XD3 presenta tre diversi pattern di omologia: la parte iniziale e la finale presentano un'elevata omologia con il ceppo di riferimento QX mentre la parte centrale presenta una maggiore similitudine con il ceppo 4/91.

L'analisi della ricombinazione ha confermato la presenza di un evento di ricombinazione, confermato con tutti i metodi utilizzati, per i due ceppi italiani e il ceppo XD3. In tutti i tre casi le sequenze di QX e 4/91 sono state identificate rispettivamente come parentale maggiore e minore ma sono state identificate delle differenze nei breakpoint tra i ceppi italiani e il ceppo cinese. Infatti nei primi, il breakpoint si localizza tra i nt 875-893 e 1045-1065 rispettivamente per i ceppi italiani del 2014 e 2012; nel secondo, il breakpoint è più ampio e è situato tra i nt 881 e 1315. (figura n.2).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo lavoro segnala la circolazione dal 2012 di ceppi IBV altamente correlati con un ceppo XD3 descritto per la prima volta in Cina nella provincia di Guandong nel 2009. Questi ceppi formano un sottogruppo chiaramente differenziato all'interno del genotipo A2 che è costituito principalmente da ceppi IBV nefropatogenici come il ceppo QX diffuso in Cina e in molti paesi europei (2). Al contrario, il ceppo XD3 e i ceppi italiani si caratterizzano per determinare forme cliniche respiratorie senza il coinvolgimento del sistema renale con sintomatologia clinica non molto grave ma complicata dalla presenza di altri agenti virali o batterici determinano un aumento della mortalità fino a raggiungere valori del 19% nell'allevamento di Forlì.

Questo studio ha rilevato inoltre la presenza di un evento di ricombinazione nella proteina S1 nei ceppi italiani e XD3, essendo stati rispettivamente identificati i ceppi QX e 4/91 come parentali maggiore e minore. I due ceppi italiani hanno mostrato un pattern di ricombinazione equivalente con un breakpoint di 170 nt nella seconda metà della S1. Il ceppo cinese XD3 ha presentato un evento di ricombinazione simile ma con un maggiore breakpoint di 435 nt. Questo conferma quanto in precedenza riportato da altri autori (6) sull'elevata frequenza di eventi

ricombinanti nel virus IBV, eventi che possono apparire distribuiti su tutto il genoma virale ma con una maggiore probabilità nelle proteine non strutturali 2, 3, 16 e la proteina S1. Considerata la frequenza con cui compaiono questi eventi, è stato ipotizzato che la ricombinazione sia il principale meccanismo responsabile della diversità genetica e antigenica del virus IBV. La differenziazione in sierotipi dipende dalle variazioni della proteina S1, specialmente se si trovano in epitopi neutralizzanti; per questo motivo, eventi di ricombinazione avvenuti all'interno della proteina S1 potranno determinare con maggiori probabilità la comparsa e successivo adattamento di nuovi genotipi o sierotipi. La continua apparizione di nuove varianti antigeniche può però rendere problematica la realizzazione di adeguate profilassi immunizzanti; questo fa sì che indagini epidemiologiche indirizzate alla caratterizzazione dei ceppi IBV isolati in ogni territorio siano di notevole importanza nella scelta di programmi vaccinali in grado di conferire una buona protezione.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and Naylor CJ.(1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28:593-605.
2. Ji J, Xie J, Chen F, Shu D, Zuo K, Xue C, Qin J, Li H, Bi Y, Ma J and Xie Q. (2011). Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009. *Virology* 421:184
3. Jungherr EL, Chromiak TW and Luginbuhl RE. (1956). Immunological differences in strains of Infectious bronchitis. Proc. 6th Ann. Meet. USLSA, 203-205.
4. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-2463
5. 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* 28:2731-2739.
6. Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH and Jackwood MW. (2011). Recombination in Avian Gamma-Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Viruses* 3: 1777-1799.

Figura n.1 - Albero filogenetico Neighbor-Joining ottenuto tramite Bootstrap con 1000 repliche basato sulle sequenze parziali del gene S1. Sono stati riportati solo i valori di bootstrap >70%. I grassetto sono identificati i ceppi analizzati in questo studio.

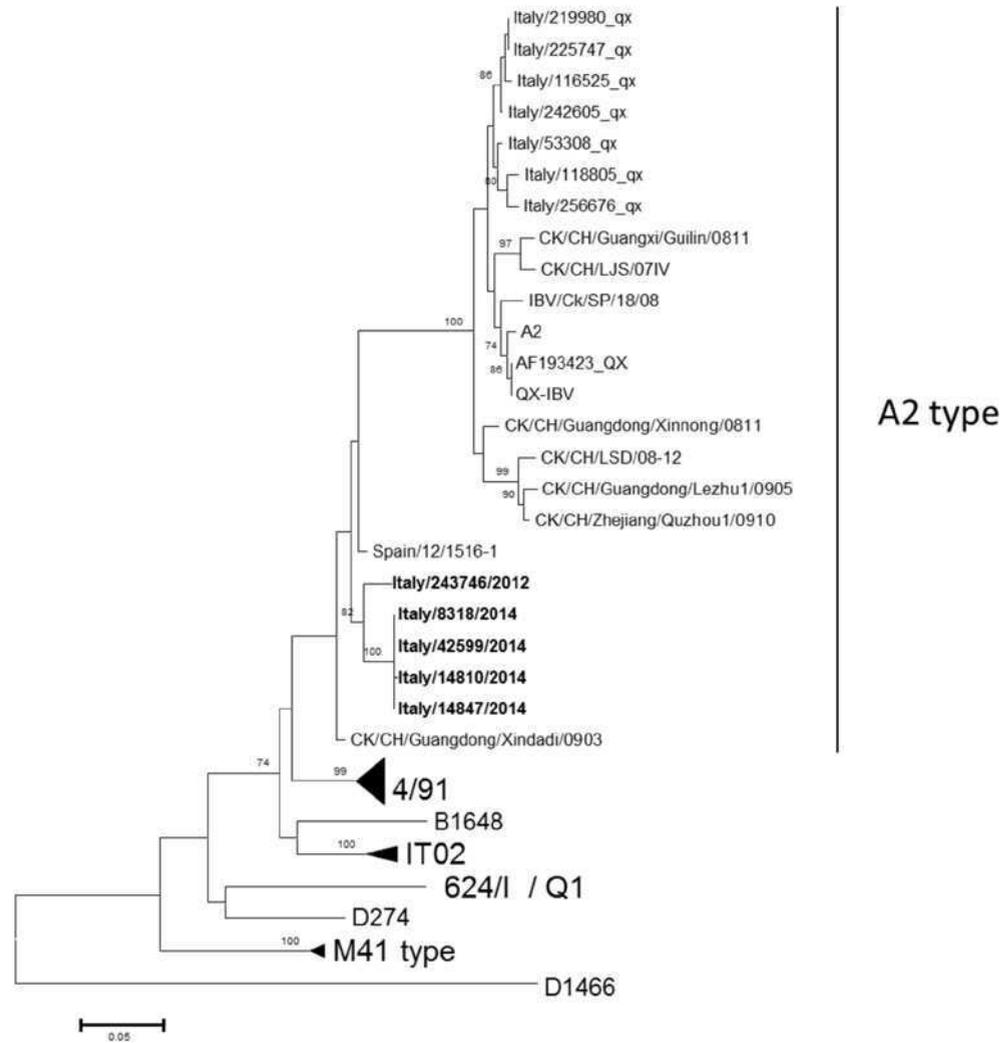


Figura n.2 - rappresentazione grafica dell'evento di ricombinazione identificato con tutti i metodi inclusi nell'analisi utilizzando il software DDP3. Per ogni evento la posizione nucleotidica del inizio e fine breakpoint sono riportati. A) evento di ricombinazione identificato nel ceppo XD3, B) nel ceppo Italy/8318/14, C) nel ceppo Italy/243746/12.

