

SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA DI UN CEPPLO DI IBV GENOTIPO Q1-LIKE ISOLATO IN ITALIA NEL 2013

Listorti V.¹, Franzo G.², Lupini C.¹, Naylor C.J.³, Laconi A.¹, Felice V.¹, Drigo M.², Catelli E.¹, Cecchinato M.²

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – ITALIA*

² *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), ITALIA*

³ *Department of Infection Biology, Faculty of Health and Life Sciences, University of Liverpool, Leahurst Campus, Neston CH64 7TE, United Kingdom*

Summary

Since 1996 a new Infectious Bronchitis virus (IBV) genotype, referred to as Q1, circulated in China and was reported for the first time in Italy in 2011, associated with an increase of mortality, kidney lesions and proventriculitis. During a 2013 Northern Italian outbreak of respiratory disease in a chicken flock, an IBV strain was detected by RT-PCR and characterized as Q1-like. The virus was isolated and named γ CoV/Ck/Italy/I2022/13. All coding regions of the isolate were sequenced and compared with 130 complete genome sequences of IBV and TCoV, downloaded from ViPR, and showed most identity with a Chinese strain CK/CH/LDL/97I (p-distance=0.044). To identify potential recombination events a complete genome SimPlot analysis was carried out which revealed the presence of possible multiple recombination events, but the minor parent strains remained unknown. A phylogenetic analysis of the complete S1 gene was performed using all complete S1 sequences available on ViPR and showed that the isolate clustered with an Q1-like strain isolated in Italy in 2011 (p-distance=0.004) and a group of Chinese Q1-like strains isolated from the mid 90's (p-distance=0.001 with GenBank Accession Number CK 577410). It could be hypothesized that the isolate descended from the Italian 2011 Q1-like strain or was the result of a separate introduction from China, through commercial trade or migratory birds; but the data did not distinguish between these possibilities

INTRODUZIONE

Il virus della Bronchite Infettiva (IBV) è un virus a polarità positiva, a singolo filamento di RNA appartenente alla famiglia delle *Coronaviridae*, genere *Coronavirus*. Presenta un genoma di circa 27.6 Kb (5-UTR-1a/1ab-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3 UTR). IBV è responsabile di gravi perdite economiche nel settore avicolo (Jackwood e de Wit, 2013) dovute a infezioni del tratto respiratorio superiore, associate anche a infezioni batteriche secondarie, e dei reni. Nei riproduttori può colpire anche l'apparato riproduttore influenzando negativamente l'ovodeposizione e la qualità delle uova prodotte.

Le strategie di controllo della malattia sono principalmente basate sul largo utilizzo della vaccinazione sebbene l'immunità indotta dai vaccini è a volte poco protettiva a causa della limitata cross-protezione esistente tra i diversi genotipi (de Wit et al.,

2011; Cook et al., 2012). Infatti, il genoma virale di IBV è incline a mutazioni puntiformi (sostituzioni, inserzioni e delezioni) e a più estensivi fenomeni di ricombinazione, che risultano nell'origine di un gran numero di varianti di IBV (Thor et al., 2011; Jackwood et al., 2012).

Dal 1996 la presenza di un nuovo genotipo del virus di IBV, denominato Q1, è stata evidenziata in Cina (Yu et al., 2001), ed è stato riportato per la prima volta in Italia nel 2011, associato ad un aumento di mortalità preceduto da sintomatologia respiratoria, casi di nefrite e proventricolite (Toffan et al., 2011; Toffan et al., 2013).

Nel 2013, durante un focolaio di malattia respiratoria in un allevamento di broiler localizzato in nord Italia, è stata nuovamente riscontrata la circolazione di un ceppo genotipizzato, sulla base del sequenziamento della regione ipervariabile del gene S1, come Q1-like.

Il virus è stato quindi isolato e denominato γ CoV/Ck/Italy/I2022/13, in accordo con la nomenclatura proposta recentemente per IBV (Ducatez et al., 2014). Nel presente lavoro, l'intero genoma è stato sequenziato e comparato con 130 sequenze di genoma completo di IBV e *Turkey Coronavirus* (TCoV), scaricate da ViPR. Per identificare eventuali eventi di ricombinazione è stata eseguita un'analisi con l'utilizzo del software SimPlot sull'intero genoma. In aggiunta, la relazione fra il ceppo γ CoV/Ck/Italy/I2022/13 e altri stipiti isolati a livello mondiale è stata valutata in modo più approfondito confrontandola, tramite un'analisi filogenetica, con il più ampio database di sequenze complete del gene S1. Infine, sono state discusse le ipotesi sull'origine di questo isolato.

MATERIALI E METODI

Campionamento, diagnosi e tipizzazione di IBV.

Nel maggio del 2013, sono stati prelevati 10 tamponi orofaringei, da animali che presentavano sintomatologia respiratoria, in un allevamento di broiler di 35 giorni di età, del nord Italia. I tamponi sono stati immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti refrigerati sino al momento della preparazione dell'inoculo per l'isolamento virale. In aggiunta da questo è stato estratto l'RNA virale utilizzando il kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN S.r.l., Milano, Italia). Ai fini della diagnosi di IBV e genotipizzazione il campione è stato amplificato utilizzando la metodica descritta da Jones et al. (2005) e successivamente sequenziato. L'analisi della sequenza ottenuta ne ha permesso la caratterizzazione come genotipo Q1.

Isolamento virale

Per l'isolamento virale di IBV sono state utilizzate colture di anelli tracheali di embrione di pollo (TOC) (Cook et al., 1976). La ciliostasi osservata tre giorni post-infezione è stata considerata come indicativa della presenza di IBV. La conferma dell'isolamento è stata eseguita mediante RT-Nested PCR (Jones et al., 2005). Il virus isolato è stato denominato γ CoV/Ck/Italy/I2022/13.

Sequenziamento e analisi intero genoma

Dal terreno raccolto dal terzo passaggio in TOC è stato estratto l'RNA virale utilizzando il kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN S.r.l., Milano, Italia). Un protocollo di RT-PCR è stato messo a punto per amplificare il genoma completo di IBV, attraverso differenti PCR, i cui ampliconi presentassero estremità sovrapposte. La retrotrascrizione è stata fatta usando il kit Maxima H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA) mentre la PCR è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA).

Per massimizzare la resa finale e limitare la presenza di prodotti aspecifici, entrambe le reazioni sono state ottimizzate provando diverse combinazioni di primer, di temperatura e di concentrazione dei reagenti. I prodotti di PCR sono stati inviati ad un servizio esterno di sequenziamento (Macrogen Europe).

Tutti i cromatogrammi sono stati analizzati utilizzando FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). Le sequenze sono state allineate con una sequenza IBV di riferimento (*Accession Number* JQ088078) utilizzando Geneious (<http://www.geneious.com/>) e la sequenza consenso è stata generata utilizzando lo stesso software. Centotrenta sequenze di genomi completi di IBV e TCoV sono state scaricate da ViPR (Pickett et al., 2012) ed allineate utilizzando il software MAFFT 7 (Katoh e Standley, 2013). A partire da questo database sono stati ricostruito un albero e un network filogenetico utilizzando rispettivamente il metodo MaximumLikelihood (ML) implementato in PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) e l'algoritmo NeighborNet del software SplitsTree4 v4.12.3 (Huson and Bryant, 2010).

Quest'ultimo ha permesso di avere una panoramica preliminare sulla presenza e frequenza dei fenomeni di ricombinazione. Questi sono stati poi approfonditi, in particolare per il ceppo in esame, utilizzando il software SimPlot.

Sequenziamento e analisi regione codificante per la proteina S1

La regione codificante per la proteina S1 è tradizionalmente utilizzata per genotipizzare e classificare IBV. Un'analisi filogenetica è stata eseguita a partire da tutte le sequenze complete o quasi complete (almeno 1550 bp) del gene S1 scaricate da ViPR (<http://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>). Per incrementare la risoluzione nella definizione delle relazioni fra ceppi, una nuova analisi è stata svolta su un sottoinsieme di queste sequenze che includesse anche quella del ceppo γ CoV/Ck/Italia/I2022/13.

RISULTATI

Questo lavoro riporta per la prima volta il sequenziamento del genoma completo (regioni codificanti) di un ceppo IBV genotipo Q1 (γ CoV/Ck/Italia/I2022/13) isolato in Italia da broilers con sintomatologia respiratoria. È stata ottenuta una sequenza di 27403 nt (minima copertura 2X). L'albero filogenetico basato sul genoma completo evidenzia che il ceppo γ CoV/Ck/Italia/I2022/13 clusterizza con due sequenze cinesi

nominate *Accession number* JX195177 e JX195178 (p-distance=0.044). Il network filogenetico conferma la stretta correlazione di questi due ceppi con il nostro isolato, sebbene la presenza di molteplici reticolazioni suggerisca la presenza di frequenti fenomeni di ricombinazione (Figura 1). La comparazione con le 130 sequenze di genoma completo disponibili conferma la stretta correlazione tra il nostro ceppo e JX195177/JX195178, nella maggior parte del genoma, eccezion fatta per le regioni 841-2812, 3389-9926, 22355-23143 e 25356-26027. Questa variazione nella percentuale d'identità in queste regioni suggerisce fortemente che γ CoV/Ck/Italy/I2022/13 ha subito fenomeni di ricombinazione. Sfortunatamente la ricerca eseguita mediante il software BLAST, rivela l'assenza di correlazioni strette tra le sequenze di tali regioni e quelle disponibili nei database, rendendo impossibile l'identificazione dei ceppi parentali minori. L'albero filogenetico basato sulle sequenze codificanti per la proteina S1 confermano che il nostro isolato clusterizza con JX195177/JX195178. Sebbene questo cluster includa anche una sequenza Italiana (JQ290229), la minor distanza genetica si riscontra nei confronti di stipiti Cinesi (Figura 2).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il ceppo IBV genotipo Q1 (γ CoV/Ck/Italy/I2022/13) isolato e caratterizzato in questo lavoro, risulta strettamente correlato a stipiti cinesi, classificati come appartenenti al genotipo Q1. Tuttavia una significativa, sebbene minore, percentuale di identità nucleotidica nel gene S1 è stata anche riscontrata con un ceppo IBV (JQ290229) isolato in Italia nel 2011 (Toffan et al., 2011).

Sulla base dei risultati ottenuti sono state proposti diversi scenari sulle origini del ceppo γ CoV/Ck/Italy/I2022/13. È infatti possibile ipotizzare che il ceppo isolato nel presente lavoro sia un discendente del ceppo JQ290229, circolante ed evolutosi in Italia. Alternativamente entrambi potrebbero essere stati introdotti dall'Asia, in momenti distinti, attraverso importazioni non dichiarate o per mezzo di uccelli migratori (Cavanagh et al., 2005). Anche se la correlazione più stretta con i ceppi cinesi rende la seconda ipotesi più probabile, la possibilità di un'evoluzione convergente fra ceppi italiani e cinesi non può essere esclusa. Un'indagine più approfondita su tratti più ampi di genoma potrebbe, anche grazie alla valutazione e comparazione dei pattern di ricombinazione, fare luce sulle vie di introduzione di questo genotipo nel nostro Paese. È interessante notare come altre due sequenze italiane (JQ901492 e KJ941019) siano parte del medesimo cluster di γ CoV/Ck/Italy/I2022/13 (p-distance di 0.058 e 0.06) (Figura 2). Il ceppo JQ901492 fa parte del genotipo 624I, che è stato ipotizzato come progenitore del genotipo Q1, importato in passato in Cina e, dopo un periodo di evoluzione indipendente, reintrodotta in Italia. La grande differenza genetica tra la sequenza JQ901492 e quella del primo isolato Q1, campionato solo qualche anno dopo, difficilmente, però, supporta questa ipotesi. Sfortunatamente anche se il genotipo 624I è stato riportato e sequenziato in Italia a partire dagli anni 60 (Taddei et al., 2012), il ceppo JQ901492, campionato nel 1994, rappresenta la più vecchia sequenza disponibile del genotipo 624I. La scarsità di dati impedisce quindi di supportare o screditare tale ipotesi. Ancora una volta viene messa in luce l'importanza di rendere disponibili alla comunità scientifica le sequenze ottenute.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D, (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34: 439-448.
2. Cook JK, Darbyshire JH, Peters RW, (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* 50: 109-118.
3. Cook JK, Jackwood M, Jones RC, (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41: 239-250.
4. de Wit JJ, Cook JK, van der Heijden HM, (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40: 223-235.
5. de Wit J, Guerrero P, Calvo J, Hidalgo H, (2012). Report of the genotyping, pathotyping, and protectotyping of resent from Chile. Proceedings of the VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, 18-21 giugno 2012, Rauischholzhausen, Germania, pp. 61-67.
6. Ducatez M, (2014). Towards suggestions on a unified nomenclature and classification of IBV strains. Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. 2nd Annual Meeting of the Cost Action FA1207. 17-20 giugno 2014, Rauischholzhausen, Germania: p. 416.
7. Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O, (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321.
8. Huson DH, Bryant D, (2010). User Manual for SplitsTree4 V4.11.3.
9. Jackwood MW, Hall D, Handel A, (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1305-1311.
10. Jackwood MW e De Wit S, (2013). Infectious bronchitis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, *Diseases of poultry*, 13^o edizione, Wiley-Blackweel, pp. 139-159.
11. Jones R, Worthington K, Capua I, Naylor C, (2005). Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Veterinary Record-English Edition* 156: 646-647.
12. Katoh K, Standley DM, (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772-780.
13. Pickett BE, Greer DS, Zhang Y, Stewart L, Zhou L, Sun G, Gu Z, Kumar S, Zaremba S, Larsen CN, Jen W, Klem EB, Scheuermann RH, (2012). Virus pathogen database and analysis resource (ViPR): a comprehensive bioinformatics database and analysis resource for the coronavirus research community. *Viruses* 4: 3209-3226.
14. Taddei R, Tosi G, Boniotti MB, Casadio M, Fiorentini L, Fabbi M, Massi P, (2012). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della Bronchite Infettiva Aviare isolati in Italia tra il 1963 ed il 1989. Atti del LI Convegno Annuale della Società Italiana di Patologia Aviare, 11-12 ottobre 2012, Parma, Italia, pp. 316-325.
15. Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH, Jackwood MW, (2011). Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3: 1777-1799.

16. Toffan A, Bonci M, Bano L, Valastro V, Vascellari M, Capua I, Terregino C, (2013). Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. *Vet. Ital.* 49: 347-355.
17. Toffan A, Terregino C, Mazzacan E, Castaldello I, Capua I, Bonci M, (2011). Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Vet. Rec.* 169: 212-213.
18. Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, Kwang J, (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45: 416-424.

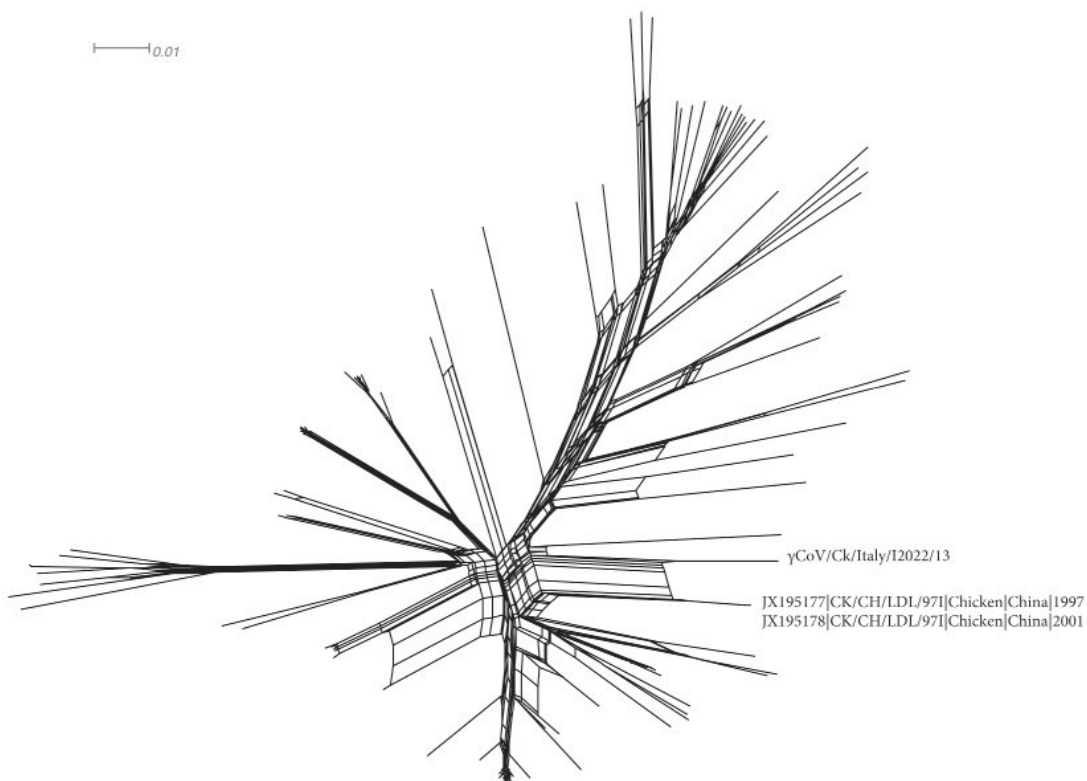


Figura 1. Network filogenetico basato sull'algoritmo NeighborNet comprendente 130 sequenze di genomi completi di IBV e TCoV. Per una più semplice comprensione sono indicati solo il ceppo riportato in questo studio e quelli ad esso strettamente correlati (*Accession number* JX195177 e JX195178).

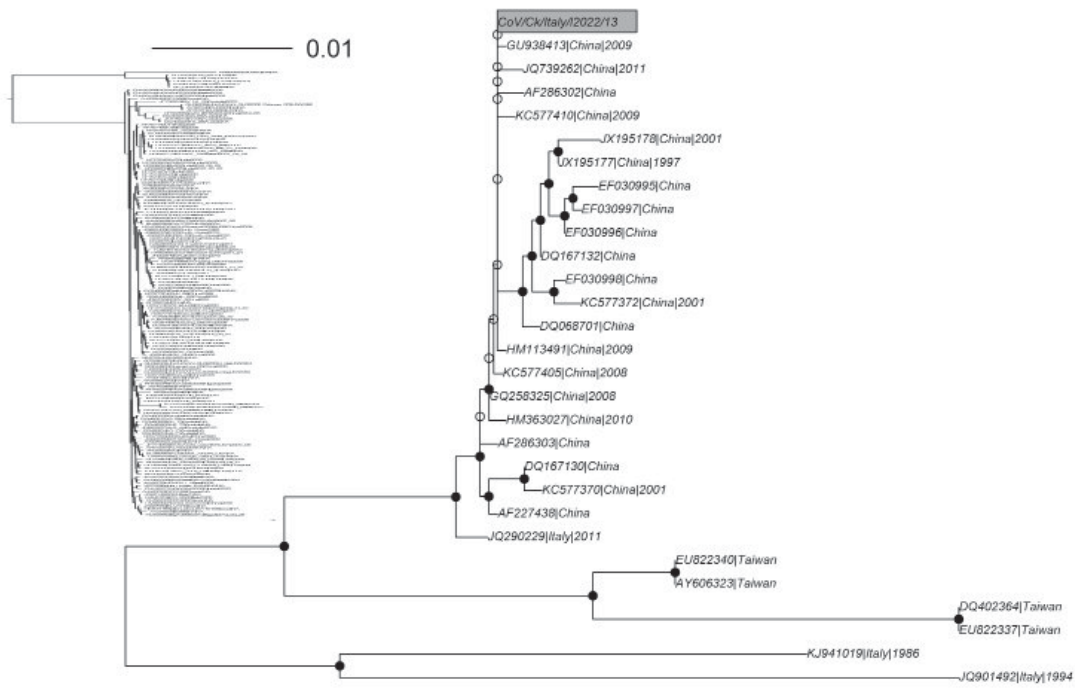


Figure 2. Albero filogenetico ottenuto con il metodo Maximum-Likelihood (ML) a partire dalle sequenze strettamente correlate con γ CoV/Ck/Italy/I2022/13 (rettangolo grigio). I nodi con valori di *bootstrap* maggiori del 70%, tra il 70 e il 50% e minori del 50%, sono rappresentati rispettivamente in nero, grigio e bianco. Il cluster corrispondente è evidenziato in rosso nell'albero basato su tutte le sequenze di S1 analizzate (inserto di sinistra). Per facilitare la rappresentazione grafica le sequenze con valori di identità nucleotidica superiore al 95% sono state aggregate nello stesso cluster e solo una sequenza per ogni cluster è stata selezionata.