

# **IMPATTO DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI SULLE DINAMICHE DI POPOLAZIONE DEL GENOTIPO QX DI BRONCHITE INFETTIVA E SULLA FREQUENZA DEI FOCOLAI**

Franzo G.<sup>1</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

*1) Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD) - Italia.*

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

## **Summary**

L'estrema variabilità e la rapida evoluzione del virus della bronchite infettiva (IBV) hanno sempre rappresentato la sfida principale per il suo controllo a causa della limitata cross-protezione fra i diversi ceppi. Vari studi sperimentali hanno dimostrato un incremento nello spettro di protezione qualora gli animali siano vaccinati con più genotipi differenti. Ciò non di meno, le condizioni e la tempistica di somministrazione della vaccinazione in campo sono a tal punto differenti che spesso una generalizzazione dei risultati sperimentali è quantomeno questionabile. Nel presente studio è stato utilizzato un approccio di tipo epidemiologico-filodinamico per ricostruire la storia demografica del principale genotipo di campo (i.e. genotipo QX) circolante in Italia. Centonovantacinque campioni raccolti nel periodo 2012-2016 sono stati sequenziati e analizzati. Ciò ha permesso di evidenziare come sia le dinamiche di popolazione di questo virus che la frequenza di focolai clinici siano state particolarmente variabili nel corso del tempo. Di particolare rilievo è risultata la forte associazione fra questi fenomeni e i cambiamenti nelle strategie vaccinali adottate. Ciò ha permesso di dimostrare il rapporto di causa-effetto fra la somministrazione/sospensione del vaccino per IBV e le ripercussioni in termini di dimensione della popolazione virale e, soprattutto, dell'occorrenza di episodi clinici indotti da IBV. È stato quindi possibile fornire una robusta dimostrazione dell'effetto protettivo indotto della vaccinazione nella pratica routinaria di allevamento. Inoltre, il resoconto qui riportato evidenzia l'importanza di pianificare con rigore non solo le strategie di controllo ma anche il loro monitoraggio e la loro valutazione, evitando di affidarsi a pareri soggettivi ed estemporanei.

## **INTRODUZIONE**

La bronchite infettiva rappresenta una delle malattie infettive più rilevanti per l'allevamento avicolo, essendo responsabile di ingenti perdite economiche ascrivibili principalmente a sindromi respiratorie e riproduttive, diminuzione della produttività e aumento della mortalità. Sebbene l'accurata gestione delle misure di biosicurezza e dell'allevamento in generale siano fondamentali per limitare la malattia, il suo controllo è ricercato principalmente tramite la diffusa somministrazione di vaccini. Sfortunatamente, come altri Coronavirus e virus a RNA+ il virus della bronchite infettiva (IBV) presenta un elevato tasso di mutazioni e di ricombinazione (Duffy et al., 2008, Thor et al., 2011). Ciò ha portato all'emergere di una molteplicità di varianti genetiche e antigeniche la cui cross-protezione è spesso limitata (Sjaak de Wit et al., 2011). IBV in Italia si caratterizza per un elevato impatto economico, elevata

prevalenza ed eterogeneità dei genotipi presenti. Sebbene comunemente vengano identificati 5 genotipi (i.e. QX (72%), seguito da 793/B (16%), Mass (8%), Q1 (3%) e D274 (1%)) (Franzo et al., 2014), il QX è di gran lunga quello più frequentemente associato a sintomatologia clinica e, con ogni probabilità, l'unica variante di campo rilevante. Sebbene lo sviluppo di vaccini basati su genotipi omologhi sia spesso impraticabile, è stato dimostrato come l'immunizzazione con vaccini diversi, basati su genotipi differenti, determini significativi benefici in termini di ampliamento dello spettro di protezione nei confronti di altri stipiti (Cook et al., 1999). Anche in Italia i protocolli vaccinali si sono conformati a questa teoria; i polli da carne in passato sono stati vaccinati con un vaccino basato sul genotipo Mass in incubatoio seguito da un richiamo con il genotipo 793B, solitamente a due settimane di vita, somministrato in acqua da bere. Recentemente è emersa una tendenza verso la somministrazione dei 2 vaccini a un giorno di vita. Tuttavia, i costi associati alla vaccinazione e rischi di reazioni vaccinali hanno indotto diversi gruppi a sospendere o modificare i protocolli vaccinali nei confronti di IBV. In un recente studio è stato possibile dimostrare come questo abbia avuto un forte impatto sulla prevalenza dei genotipi circolanti, portando alla sostanziale scomparsa del genotipo 793B, di conseguente probabile origine vaccinale (Franzo et al., 2014). Tuttavia, il reale effetto di questi interventi sulle dinamiche della popolazione virale non è stata mai analizzato in dettaglio. Sebbene diversi studi sperimentali abbiano dimostrato l'efficacia della vaccinazione Mass+793B nel controllare l'infezione da QX (Terregino et al., 2008), la generalizzabilità di questi studi alle condizioni di campo deve essere fatta con cautela. Di contro, la raccolta della mole di dati necessaria per studi epidemiologici accurati è spesso resa impossibile da limiti economici e di fattibilità. Fortunatamente lo sviluppo di un adeguato *background* teorico e matematico ha permesso lo sviluppo di modelli in grado di ricostruire le caratteristiche evolutive e la storia demografica delle popolazioni di virus ad alto tasso evolutivo a partire dall'analisi delle loro sequenze, un metodo dimostratosi efficace per lo studio di diverse malattie di interesse umano e animale (Rodrigo and Felsenstein, 1999, Nelson et al., 2015, Lemey et al., 2009, Franzo et al., 2016).

Nel presente studio tale approccio è stato utilizzato per valutare l'effetto della sospensione e reintroduzione della vaccinazione con il genotipo 793B sulle dinamiche di popolazione del genotipo QX in Italia e sulla frequenza degli episodi di sintomatologia clinica da esso indotti.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campioni*

I campioni inclusi nel presente studio (*pool* di tamponi tracheali o cloacali o omogenati d'organo) sono stati ottenuti da 562 allevamenti di broiler dislocati nel Nord Italia nel periodo compreso fra Novembre 2012 e Aprile 2016. In tutti i casi gli animali presentavano sintomatologia potenzialmente ascrivibile a infezione da IBV. Per ciascun campione sono stati registrati i dati inerenti alla data di campionamento, all'età degli animali, alla condizione clinica e alla localizzazione geografica degli allevamenti. L'arco temporale considerato può essere sinteticamente diviso in 5 fasi, differenziabili per il protocollo vaccinale applicato: fino alla tarda estate 2013 gli animali sono stati routinariamente vaccinati con Mass (1 gg di vita) e 793b (14 gg di vita), successivamente la vaccinazione in campo con il genotipi 793B è stata so-

spesa fino a Novembre 2014. Tuttavia, nel periodo Dicembre 2013 - Giugno 2014 è stata eseguita una vasta prova di campo con un vaccino 793B da poco registrato. A partire dal Dicembre 2015 tutti gli animali sono stati nuovamente vaccinati con la combinazione di vaccini IBV Mass+793 o Mass+QX, per lo più a un giorno di vita. Le scelte manageriali qui descritte hanno interessato la maggior parte, se non tutta, la popolazione avicola considerata.

#### *Diagnosi di IB e sequenziamento*

I campioni sono stati estratti utilizzando il kit commerciale NucleoSpin® 8/96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) e la diagnosi eziologica eseguita tramite real-time RT-PCR (Quantification of Avian Infectious Bronchitis Virus-IBV-kit; Genesig, Southampton, UK). Una regione ipervariabile del gene S è stata sequenziata utilizzando i primer XCE1-XCE2 (Cavanagh et al., 1999). Gli amplificati così ottenuti sono stati sequenziati in entrambe le direzioni tramite metodo Sanger, la loro qualità valutata utilizzando FinchTV (<http://www.geospiza.com>) mentre la sequenza consenso è stata ottenuta con CromasPro (CromasPro Version 1.5).

#### *Analisi delle sequenze*

Tutte le sequenze ottenute sono state allineate al database di referenza proposto da Valastro et al. (2016) (Valastro et al., 2016) usando MAFFT (Katoh and Standley, 2013). La presenza di fenomeni di ricombinazione è stata analizzata utilizzando RDP4 (Martin et al., 2010) e le sequenze ricombinate sono state escluse dall'analisi. Un albero filogenetico è stato quindi ricostruito mediante PhyML (Guindon et al., 2010) ed utilizzato ai fini della classificazione delle sequenze. Il miglior modello di sostituzione è stato selezionato sulla base del Bayesian information criteria (BIC), calcolato utilizzando jmodeltest (Darriba et al., 2012). Un nuovo dataset è stato definito selezionando tutte le sequenze ottenute da stipiti del genotipo QX circolante in Italia. I parametri e le dinamiche di popolazione nel tempo sono state ricostruite utilizzando un metodo basato sulla teoria della Coalescente, implementato in BEAST (Drummond et al., 2012).

#### *Focolai clinici*

Nel presente studio il numero di focolai clinici riferibili a IB è strettamente correlato al numero di sequenze ottenute poiché tutti i campioni positivi campionati durante gli episodi di malattia manifesta sono stati processati per il sequenziamento e la genotipizzazione. Per valutare la relazione fra variazioni nelle dinamiche della popolazione virale e la frequenza dei focolai ne è stata calcolata la correlazione. Considerando una possibile latenza temporale fra variazioni nella popolazione dei ceppi IBV genotipo QX e le ripercussioni cliniche, tale analisi è stata ripetuta correlando le dimensioni della popolazione virale (i.e. la così detta diversità genetica relativa; *effective population size* ( $N_e$ ) x *generation time* ( $\tau$ )) con il numero di focolai traslati in un range di  $\pm 8$  mesi.

## **RISULTATI**

### *Storia demografica della popolazione virale*

Dai campioni considerati nel presente studio sono state ottenute 195 sequenze di stipiti classificati come QX, corrispondenti a una regione di 269 nucleotidi del gene S1. La ricostruzione delle dinamiche della popolazione virale nel tempo ha rivelato la presenza di pattern assai complessi. A partire dal *Most Recent Common Ancestor* (MRCA) (i.e. 2011,94; 95HPD 2011,70-2012,02) la popolazione virale è aumentata

rapidamente fino alla fine del 2012 quando è diventata sostanzialmente stabile. Una diminuzione transitoria è stata osservata all'incirca fra Dicembre 2013 e Giugno 2014, seguita da un nuovo drammatico incremento che ha raggiunto l'apice durante Febbraio 2015. Il trend successivo si è caratterizzato per una progressiva diminuzione, prima marcata poi meno evidente, che ha portato al raggiungimento di valori comparabili a quelli riscontrati all'inizio dello studio (Fig. 1).

#### *Focolai di IB*

Un totale di 527 focolai potenzialmente ascrivibili a IBV sono stati identificati e sottoposti a diagnosi differenziale utilizzando metodiche di biologia molecolare. In 356 casi è stata effettivamente evidenziata la presenza di ceppi di IBV ascrivibili a quattro genotipi fra cui il QX è risultato nettamente il più rilevante. Brevemente, sono stati identificati 253 (71,06%) QX, 65 (18,25%) 793B, 32 (8,98%) Mass e 5 (1,40%) Q1. Il numero di focolai indotti da QX è risultato altamente associato alle dimensioni della popolazione virale ed in particolare la correlazione è risultata massima quando la diversità genetica relativa è stata correlata con il numero di focolai riscontrati 3 mesi dopo. Più nello specifico, una correlazione di 0,78 è stata osservata con il numero totale di episodi clinici mentre i valori di  $r$  sono risultati di 0.39, 0.61, 0.21 e 0.78 rispettivamente per il genotipo 793/B, Mass, Q1 and QX.

## **DISCUSSIONE**

La bronchite infettiva rappresenta la principale patologia infettiva che colpisce gli allevamenti avicoli nei paesi sviluppati e impone un rilevante sforzo gestionale e ingenti costi per il suo controllo. Il genotipo QX è probabilmente uno dei più rilevanti a livello mondiale e studi condotti sul nostro territorio hanno confermato questa evidenza (Sjaak de Wit et al., 2011, Franzo et al., 2014, Jackwood, 2012). Diverse prove sperimentali hanno più volte confermato che la somministrazione di una combinazione di vaccini basati sul genotipo Mass (a un giorno di vita) e 793B (a 2 settimane di vita) determina lo sviluppo di un'immunità protettiva anche nei confronti di questo genotipo (Terregino et al., 2008). Sfortunatamente la mancanza di adeguate prove di campo e dati epidemiologici ha ostacolato la valutazione dell'efficacia di questi vaccini in un contesto reale. Questo, associato all'occorrenza di più o meno sporadiche reazioni post-vaccinali e alla mancanza di un'oggettiva valutazione del rapporto costi-benefici ha fatto emergere, anche in Italia, un certo scetticismo sull'uso della vaccinazione, favorendo l'interruzione della sua somministrazione, in particolare della seconda dose, in allevamento, di 793B (Franzo et al., 2014).

Paradossalmente questo ci ha fornito la straordinaria possibilità di valutare sistematicamente, utilizzando un approccio epidemiologico e di filodinamica, l'importanza della messa in atto di adeguate strategie vaccinali. L'uso di modelli matematici basati sulla teoria della Coalescente e delle sue successive evoluzioni si è dimostrata utile in diversi studi orientati alla comprensione delle dinamiche epidemiologiche di diversi virus umani e animali. In particolare, questi metodi permettono la ricostruzione dell'evoluzione e della storia demografica delle popolazioni virali mediante lo studio della "traccia" che questi elementi lasciano nel patrimonio genetico del patogeno (Drummond et al., 2005). Conseguentemente le stime ottenute non dipendono direttamente dall'attività di campionamento, permettendo quindi di studiare periodi temporali per i quali non sono disponibili dati e minimizzando l'inevitabile *bias* legato all'intensità di campionamento.

Per poter considerare efficace un vaccino è necessario che questo sia in grado di limitare la diffusione dell'infezione e controllare la gravità e la frequenza dei focolai. Il peculiare scenario Italiano ha permesso di valutare questa ipotesi comparando, in diversi momenti temporali, la popolazione di IBV genotipo QX in condizioni di diversa esposizione al vaccino (i.e. esposto; non-esposto). Appare evidente che la combinazione Mass-793B è risultata in grado di controllare, almeno parzialmente, la diffusione di ceppi QX durante la prima fase dell'epidemia, confermando quindi i risultati delle prove sperimentali (Terregino et al., 2008). Sebbene il riscontro di episodi di sintomatologia clinica evidenziati nel presente studio strida con quanto usualmente riportato in corso di infezioni sperimentali, è bene ricordare come in condizioni di campo la somministrazione del vaccino sia spesso sub-ottimale. Questo, associato alla presenza di altri co-fattori può facilmente giustificare l'assenza di una protezione assoluta. Dopo la sospensione della vaccinazione lo scenario epidemiologico rimase immutato per circa un anno. La transitoria diminuzione della popolazione virale stimata fra dicembre 2013 e giugno 2014 rispecchia temporalmente l'esecuzione di una prova di campo su larga scala effettuata utilizzando un nuovo vaccino da poco registrato, anche esso basato sul genotipo 793B. Ciò può far supporre una maggiore efficacia di questa strategia rispetto alle precedenti. Tuttavia, le aziende da noi seguite decisero di interrompere questo piano poiché la riduzione nel numero dei focolai fu considerata non rilevante. A questa decisione è seguito un drammatico aumento nella popolazione virale che ha preceduto di circa 2-3 mesi il picco del numero di casi clinici. Questa evenienza conforta l'insufficiente protezione indotta dal solo genotipo Mass, già evidenziata in studi sperimentali (Sun et al., 2011). Il ritardo fra l'incremento della popolazione di QX e le ripercussioni cliniche è probabilmente ascrivibile alla necessità di raggiungere un'elevata pressione infettante, una ipotesi che può anche esser addotta per spiegare l'apparente limitata efficacia dell'introduzione del nuovo vaccino 793B. Infatti, è possibile che un carico virale relativamente basso possa essere tollerato senza che questo esiti in episodi di sintomatologia conclamata. Risulta più ostico spiegare le ragioni del lungo intervallo di tempo intercorso fra la prima rimozione della vaccinazione e le sue ripercussioni. Altri fattori concomitanti quali co-infezioni, fattori climatici, varie scelte manageriali, etc. possono aver contribuito a questo fenomeno e renderanno necessari ulteriori approfondimenti. Lo scenario qui riportato e la relativa mancanza di informazioni evidenzia ancora di più la necessità di una sistematica e rigorosa valutazione degli effetti a lungo termine delle politiche manageriali. Difatti, valutazioni soggettive ed estemporanee possono esitare in distorsioni drammatiche nella nostra conoscenza del panorama e delle dinamiche epidemiologiche con esiti economicamente rilevanti. Dopo la reintroduzione della vaccinazione gli effetti sia sulla circolazione virale che sulla presenza di sintomatologia sono stati immediati, ripristinando una situazione comparabile a quella iniziale e supportando di conseguenza un forte nesso causale fra i due eventi. Fra i fattori che possono aver contribuito al grande successo del nuovo intervento due meritano particolare attenzione. In primo luogo si è iniziato a vaccinare parte della popolazione Italiana di broiler con dei vaccini basati sul genotipo QX, per il quale è ragionevole assumere che sia in grado di indurre un'immunità ottimale nei confronti di ceppi omologhi (Geerligts et al., 2011). In seconda istanza, in particolare nell'ultimo anno, si è osservato un trend crescente verso la somministrazione spray di entrambi i vaccini (Mass e 793B) a un giorno di vita. Tradizio-

nalmente si ritiene che i benefici di una doppia vaccinazione siano massimizzati quando le stesse sono somministrate a circa 2 settimane di distanza (Sjaak de Wit et al., 2011). Data l'apparente contraddizione, è probabile che i vantaggi legati alla nuova strategia siano ascrivibili ad una maggiore standardizzazione e copertura vaccinale e ad una diminuzione delle reazioni avverse rispetto alla somministrazione in allevamento a 14gg di età.

Parallelamente questo studio ha permesso di fornire ulteriori evidenze sulla probabile origine vaccinale del genotipo 793B in Italia. In un precedente studio era stato riportato come l'interruzione della somministrazione di questo vaccino in un cospicuo numero di allevamenti ne avesse comportato una sostanziale scomparsa (Franzo et al., 2014). In questo studio di "follow-up" solamente quattro stipiti 793B sono stati identificati durante il periodo di "non vaccinazione" mentre, a seguito della sua reintroduzione, il riscontro di stipiti 793B, indistinguibili da quelli vaccinali, è ridivenuto un evento frequente.

Complessivamente le analisi condotte hanno permesso di fornire un'estensiva panoramica dell'efficacia e utilità dei protocolli vaccinali adottati nel nostro paese per il controllo dell'infezione da IBV, genotipo QX. La presenza di una rilevante "latenza" fra l'attuazione di determinate scelte manageriali e le loro ripercussioni pratiche evidenzia l'azione di altri fattori (biologici, epidemiologici, casuali, etc.) nel mediare o ritardare gli effetti delle nostre strategie di controllo. Appare quindi doveroso sottolineare l'importanza di una pianificazione accurata non solo dei piani di controllo ma anche del loro rigoroso ed esteso monitoraggio e valutazione, rigettando la tentazione di confidare eccessivamente in impressioni soggettive ed estemporanee.

## **BIBLIOGRAFIA**

Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., Naylor, C., 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28, 593-605.

Cook, J.K., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B., 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477-485.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.

Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1185-1192.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969.

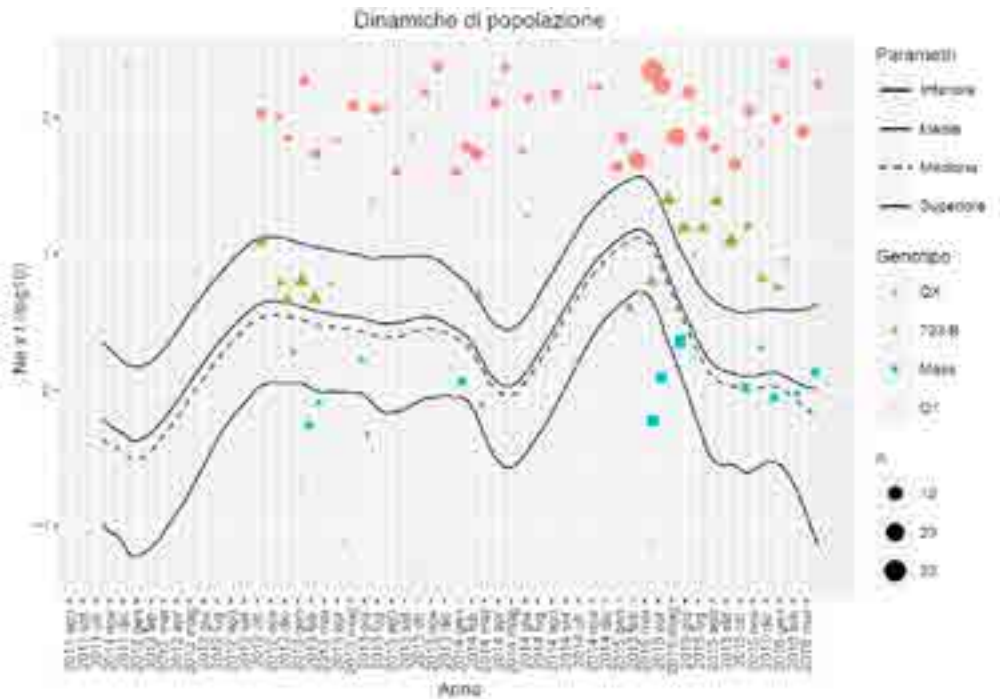
Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9, 267-276.

- Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M., 2016. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 100, 269-280.
- Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E., Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine* 32, 6765-6767.
- Geerligs, H., Boelm, G., Meinders, C., Stuurman, B., Symons, J., Tarres-Call, J., Bru, T., Vila, R., Mombarg, M., Karaca, K., 2011. Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathol.* 40, 93-102.
- 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.
- Jackwood, M.W., 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56, 634-641.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772-780.
- Lemey, P., Suchard, M., Rambaut, A., 2009. Reconstructing the initial global spread of a human influenza pandemic: A Bayesian spatial-temporal model for the global spread of H1N1pdm. *PLoS Curr.* 1, RRN1031.
- Martin, D.P., 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.
- Nelson, M.I., Viboud, C., Vincent, A.L., Culhane, M.R., Detmer, S.E., Wentworth, D.E., Rambaut, A., Suchard, M.A., Holmes, E.C., Lemey, P., 2015. Global migration of influenza A viruses in swine. *Nature communications* 6.
- Rodrigo, A.G., Felsenstein, J., 1999. Coalescent approaches to HIV population genetics. *The evolution of HIV*, 233-272.
- Sjaak de Wit, J.J., Cook, J.K., van der Heijden, H.M., 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223-235.
- Sun, C., Han, Z., Ma, H., Zhang, Q., Yan, B., Shao, Y., Xu, J., Kong, X., Liu, S., 2011. Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains. *Avian Pathol.* 40, 43-54.

Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M., Capua, I., 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 37, 487-493.

Thor, S.W., Hilt, D.A., Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Jackwood, M.W., 2011. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3, 1777-1799.

Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I., 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution* 39, 349-364.



**Fig. 1.** Bayesian skyline plot delle dinamiche di popolazione dei ceppi Italiani di IBV genotipo QX. Media, mediana e intervallo superiore e inferiore di 95HPD (Highest Posterior Density) della diversità genetica relativa (i.e.  $Ne \cdot \tau$ ) sono riportati nel tempo. In numero di focolai mensili associati a ciascun genotipo è rappresentato mediante simboli le cui dimensioni sono proporzionali al numero dei focolai.