

EVIDENZA DI GAMMA E DELTACORONAVIRUS IN ALLEVAMENTI DI QUAGLIE E FAGIANI IN ITALIA

Torres C.A.¹, Listorti V.², Lupini C.², Franzo G.³, Drigo M.³, Catelli E.², Brandão P.E.¹, Cecchinato M.³

¹ Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, College of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando, Marques de Paiva, 87, CEP 05508 270, São Paulo, SP, Brazil.

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

³ Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD) - Italia.

Summary

On the view of the restricted knowledge on the diversity of coronaviruses in poultry other than chicken, this study aimed to investigate the molecular diversity of coronaviruses in quail, pheasant and partridge from two regions of Northern Italy. For these purpose, pools of tracheal and cloacal swabs from European quail (*Coturnix coturnix*), and intestinal tract of pheasants (*Phasianus colchicus*) and partridge (*Perdix perdix*) flocks, with or without enteric signs, were collected during 2015. An Avian coronavirus (*Gammacoronavirus*) was detected in quails not vaccinated against Infectious Bronchitis Virus (IBV) and pheasant vaccinated with an IBV Massachusetts serotype. Based on DNA sequences for the gene encoding the S protein, the avian coronaviruses detected in the quail and pheasant are related to the IBV 793B and Massachusetts types, respectively. However, RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) analyses showed the susceptibility of quail also to Deltacoronaviruses, suggesting that quail and pheasant avian coronaviruses share spike genes identical to chicken IBV spike genes and quail might host *Deltacoronavirus*.

INTRODUZIONE

I Coronavirus (CoV) sono virus con genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva appartenenti all'ordine *Nidovirales*, famiglia *Coronaviridae*, sottofamiglia *Coronavirinae*. I CoV sono comunemente classificati in 4 generi: *Alphacoronavirus* (α -CoV) e *Betacoronavirus* (β -CoV) infettano molte specie di mammiferi, dai pipistrelli all'uomo (Chan et al., 2013), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) e *Deltacoronavirus* (δ -CoV) sono molto diffusi nelle specie aviari e sono stati riportati in maniera sporadica nei mammiferi (Woo et al., 2010; Woo et al., 2012; ICTV, 2014; Fehr e Perlman, 2015). Il Coronavirus aviare conosciuto anche come virus della Bronchite Infettiva del pollo (IBV), è un *Gammacoronavirus* in grado di replicare negli epiteli degli apparati respiratorio, riproduttivo, urinario ed enterico (Cavanagh, 2003; Cavanagh, 2005; Villareal et al., 2007). Ceppi di IBV e IBV-like sono stati isolati nel pollo, nel tacchino e in molte altre specie di uccelli come oche, anatre, piccioni, fagiani (Cavanagh et al., 2002) e quaglie (Circella et al., 2007; Torres et al., 2013), in alcuni casi in assenza di sintomatologia clinica (Cavanagh, 2005), suggerendo la possibilità che tali specie possano fungere da *reservoir* per IBV (de Wit et al., 2011). Ceppi virali

classificati come *Deltacoronavirus* (de Groot et al., 2012), sono stati identificati in uccelli selvatici (Woo et al., 2009; Chu et al., 2011; Durães-Carvalho et al., 2015). Pochi sono i dati disponibili sui coronavirus isolati in specie aviari differenti dal pollo. Il presente lavoro mira a contribuire ad una maggiore conoscenza delle caratteristiche genetiche di tali virus circolanti in allevamenti di quaglie, fagiani e starne.

MATERIALI E METODI

Allevamenti

L'indagine è stata condotta, durante il 2015, in 10 allevamenti ed ha interessato 17 gruppi di quaglie, 8 di fagiani e 2 di starne. Le caratteristiche dei gruppi, i programmi vaccinali applicati e i dettagli relativi ai campionamenti eseguiti sono riportati in tabella 1. Tutti gli allevamenti inclusi nello studio erano localizzati in nord Italia, in particolare in Veneto ed Emilia-Romagna, che sono considerate zone ad elevata densità di allevamenti avicoli. Tutti i gruppi sono stati monitorati durante l'intero ciclo produttivo per valutare l'eventuale presenza di sintomatologia respiratoria o enterica.

Campionamenti

In alcuni gruppi sono stati eseguiti 10 tamponi tracheali e 10 tamponi cloacali ed in altri sono stati prelevati tratti di intestino (5 animali/gruppo). I tamponi sono stati fatti asciugare all'aria per 15 minuti, prima della conservazione a -80°C. Tutti i campioni sono stati processati in pool per indagini molecolari di seguito riportate.

Estrazione dell'RNA virale

I pool dei tamponi tracheali e cloacali di ciascun gruppo sono stati eluiti in 2 ml di PBS sterile ed i pool degli intestini sono stati preparati come sospensione 50% P/V in PBS e centrifugati a 12.000 x g per 15 minuti a 10°C. L'RNA è stato estratto da 200 µl di eluito o di surnatante utilizzando l'High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Monza, Italia) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

One step RT-Nested PCR di screening per IBV

Tutti i pool sono stati sottoposti ad una *One step RT-Nested PCR* di screening per Coronavirus aviare, che amplifica la regione 3'- *untranslated region* (UTR), come descritto da Cavanagh et al., (2002). Per questa reazione sono stati utilizzati gli enzimi SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Analisi dei geni codificanti per l'RNA polimerasi RNA dipendente (RpRd) e per la proteina dello spike (S).

I pool positivi alla *One step RT-Nested PCR* di screening per Coronavirus aviare sono stati successivamente testati utilizzando i seguenti protocolli:

- una *Nested-Multiplex RT-PCR* che amplifica una porzione del gene S, capace di individuare e discriminare i genotipi di IBV 793/B, D274 e Massachusetts (Cavanagh et al., 1999);
- una RT-PCR generica capace di amplificare la regione codificante per la RpRd di tutti i coronavirus (Chu et al., 2011);
- una RT-PCR generica per IBV diretta su una porzione del gene S, descritta da Worthington et al., (2008).

Tutti i protocolli di RT-PCR sono stati eseguiti utilizzando gli enzimi SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Gli amplificati sono stati inviati alla MacroGen Europe per il sequenziamento tramite metodo Sanger. Tutti i cromatogrammi sono stati analizzati manualmente utilizzando il programma *Finch TV* 1.4.0. (© 2004-2006 Geospiza Inc). Le sequenze di ogni campione sono state ottenute utilizzando l'applicazione *Consensus* del software *BioEdit* 7.0.9.0 (Tom Hall © 1997-2007) allineandole con una sequenza di riferimento scaricata da *GenBank* (*accession numbers* nelle figure 1 e 2), utilizzando il programma *Clustal/W multiple alignment* dello stesso software. Gli alberi filogenetici sono stati realizzati sulle sequenze nucleotidiche di parte dei geni S ed RpRd utilizzando il software MEGA 5.2.1. (*Maximum Composite Likelihood model* con valore di *bootstrap* 1000) (Tamura et al., 2011).

RISULTATI

Quindici gruppi (9 di quaglie e 6 di fagiani) di 7 allevamenti (F1, F2, F4, F5, F6, F7 ed F8) sono risultati positivi alla *One step RT-Nested PCR* di screening per i Coronavirus aviari. I Campioni ottenuti dalle starnie sono tutti risultati negativi. È stato possibile amplificare parte del gene S di alcuni dei campioni risultati positivi allo screening, con la *Nested-Multiplex RT-PCR*, per una prima genotipizzazione. I risultati di tale analisi hanno premesso di classificare gli amplificati ottenuti dalle quaglie come appartenenti al genotipo 793B e quelli ottenuti dai fagiani, al genotipo Massachusetts. I campioni da cui è stato possibile, poi, amplificare le regioni RpRd ed S del genoma, con le altre metodiche descritte, sono riportati in tabella 2. Dopo sequenziamento di questi amplificati, sono stati costruiti gli alberi filogenetici. L'albero filogenetico del gene che codifica per la RpRd (figura 1) mostra come tutte le sequenze ottenute delle quaglie clusterizzano con il genere δ -CoV. L'identità nucleotidica tra le sequenze dei ceppi delle quaglie e, rispettivamente, le sequenze del *Deltacoronavirus* B04 (*GenBank accession number* KP965434) (Durães-Carvalho et al., 2015) e del *Porcine Deltacoronavirus* è del 92.5% e dell'86%. Inoltre sono stati identificati, nel cluster delle sequenze dei *Deltacoronavirus* delle quaglie, 3 subclusters, con un'identità nucleotidica media del 95.89%, indicativi della presenza di differenti popolazioni virali. I ceppi di coronavirus evidenziati nei fagiani (figura 1) clusterizzano con il genere γ -CoV, presentando tra loro un'identità nucleotidica del 100%. L'albero filogenetico basato sulle sequenze nucleotidiche del gene S (figura 2) ha confermato i risultati ottenuti dalla *Nested-Multiplex RT-PCR*. Tutti i ceppi ottenuti dalle quaglie clusterizzano con ceppi IBV genotipo 793B (con un'identità nucleotidica media del 97%). Di questi ceppi, due (*GenBank accession numbers* KX077963 e KX077961) presentano un'identità nucleotidica media del 99.4% con un ceppo vaccinale di IBV genotipo 793B ampiamente utilizzato in Italia. I ceppi ottenuti dai fagiani clusterizzano con il genotipo Massachusetts con un'identità nucleotidica del 99%.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro sono state investigate la presenza e le caratteristiche molecolari di coronavirus in quaglie, fagiani e starnie in nord Italia. Questo ha permesso l'individuazione nelle quaglie di ceppi di Coronavirus aviari correlati nella porzione genica

che codifica per la proteina S, con IBV genotipo 793B e nei fagiani con il genotipo Massachusetts. Anche l'analisi filogenetica di parte della stessa regione, suggerisce la circolazione del genotipo 793B nelle quaglie. Questo genotipo, dopo la sua prima apparizione negli anni '90 (Gough et al., 1992) è diventato tra i più diffusi in Europa (Worthington et al., 2008). Non si può escludere l'origine vaccinale dei ceppi virali che sono stati individuati nelle quaglie durante questo studio, perché vaccini appartenenti a tale genotipo vengono ampiamente utilizzati in Italia e perché i protocolli diagnostici disponibili non ci permettono di distinguere inequivocabilmente tra ceppi di campo e vaccinali. Inoltre, un recente studio ha messo in evidenza come i ceppi di IBV 793B identificati in Italia sembrano tutti derivare dai ceppi 793B vaccinali in uso (Franzo et al., 2014). A supporto di tale ipotesi, in questo studio, è stato osservato che 2 ceppi genotipo 793B, identificati in gruppi di quaglie di un allevamento in cui erano presenti anche dei galletti vaccinati con lo stesso genotipo, presentano una elevata omologia con il vaccino applicato in quest'ultimi. I ceppi virali ottenuti dai fagiani clusterizzano con ceppi di IBV genotipo Massachusetts. Considerando che i fagiani campionati erano stati vaccinati con un ceppo vaccinale dello stesso genotipo e che questo può essere evidenziato negli animali per settimane dopo la vaccinazione (Cavanagh et al., 1999), c'è il sospetto che anche in questo caso i ceppi di IBV identificati siano di origine vaccinale. Sulla base dell'analisi delle sequenze della regione genica dell'RpRd, i ceppi di IBV identificati nei fagiani clusterizzano con ceppi appartenenti al genere γ -CoV, mentre sorprendentemente i ceppi di coronavirus delle quaglie clusterizzano con i δ -CoV. Tendendo conto della discrepanza di collocazione tassonomica dei ceppi identificati nelle quaglie in base ai risultati dell'analisi filogenetica delle regioni RpRd ed S (*Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* rispettivamente) è possibile ipotizzare che ci sia la co-circolazione in questa specie di virus appartenenti ad entrambi i generi e non sono da escludere fenomeni di ricombinazione. La ricombinazione tra ceppi di generi diversi dei coronavirus, inizialmente ipotizzata all'origine del coronavirus causa della *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), sembra però improbabile in natura (Thor et al., 2011; Woo et al., 2010). Ulteriori indagini sulla sequenza completa dei virus identificati nelle quaglie in questo studio, utilizzando protocolli di *Next Generation Sequencing*, potrebbero dare maggiori informazioni sulle caratteristiche e sull'origine di questi virus. Inoltre, il loro isolamento e l'inoculazione, in condizione sperimentali, in quaglie potrebbero confermare la sensibilità di questa specie all'infezione da δ -CoV.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology*, 32: 567-582.
2. Cavanagh D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, 34: 439-448.
3. Cavanagh D, Mawditt K, Welchmand Dde B, Britton P, Gough RE. (2002). Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (Infectious Bronchitis Virus) and turkeys. *Avian Pathology*, 31: 81-93.
4. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor CJ. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28: 593-605.

5. Chan JF, To KK, Tse H, Jin HDY, Yuen KY. (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends in Microbiology*, 21: 544-555.
6. Chu DK, Leung CY, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tse TM, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. (2011). Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of Virology*, 85: 12815-12820.
7. Circella E, Camarda A, Martella V, Bruni G, Lavazza A, Buonavoglia C. (2007). Coronavirus associated with an enteric syndrome on a quail farm. *Avian Pathology*, 36: 251-258.
8. De Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, Poon L, Rottier PJM, Talbot PJ, Woo PC, Ziebuhr J. (2012). Family Coronaviridae In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. King A, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EF, (Eds). Elsevier, Amsterdam, NL, pp. 806-828.
9. de Wit JJ, Cook JKA, van der Heijden HMJF. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology*, 40: 223-235.
10. Durães-Carvalho RL, Caserta C, Barnab ACS, Martini MC, Ferreira HL, P. A. N. Felipe PAN, Santos MB, Arns CW. (2015). Coronaviruses Detected in Brazilian Wild Birds Reveal Close Evolutionary Relationships with Beta- and Deltacoronaviruses Isolated From Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 81: 21-23.
11. Fehr AR e Perlman S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1282: 1-23.
12. Franzo G, Naylor CJ, 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.
13. Gough RE, Randall CJ, Dagless M, Alexander DJ, Cox WJ, Pearson D. (1992). A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record*, 130: 493-494.
14. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar MS. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
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. Torres CA, Villarreal LYB, Ayres GGR, Richtzenhain L, Brandão PE. (2013). An Avian Coronavirus in Quail with Respiratory and Reproductive Signs. *Avian Diseases*, 57: 295-299.
17. Villarreal LYB, Brandão PE, Chacón JL, Saldenbergs ABS, Assayag MS, Jones RC, Ferreira AJP. (2007). Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. *Avian Diseases*, 51: 974-978.
18. Woo PCY, Lau SKP, Lam CS, Lai KK, Huang Y, Lee P, Luk GS, Dyrting KC, Chan KH, Yuen KY. (2009). Comparative analysis of complete ge-

nome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *Journal of Virology*, 83: 908-917.

19. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2: 1805-1820.
20. Woo, PCY, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, J. L. Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen, KY. (2012). Discovery of Seven Novel Mam malian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86: 3995-4008.
21. Worthington KJ, Currie RJW, Jones RC. (2008). A reverse transcriptase polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*, 37: 247-257.

Tabella 1. Numero identificativo e caratteristiche degli allevamenti e dei campioni effettuati

ID Allevamento	Specie	Tempistica Campionamento	Tipo di campione	Programma Vaccinale
F1	Quaglie/Broiler	CPC ¹	TC ⁵ /TT ⁶	Broiler incubatoio: Mass/793B
F2	Quaglie	CPC	TC/TT	NV ⁷
F3	Quaglie	IC ² /MC ³	intestino	NV
F4	Quaglie	CPC	TC/TT	NV
F5	Quaglie	CPC	intestino	Riproduttori
F6	Fagiani	CPC	intestino	1 giorno Mass
F7	Fagiani	MC	intestino	NV
F8	Fagiani	MC	intestino	NV
F9	Fagiani	MC/FC ⁴	intestino	NV
F10	Starne	FC	intestino	NV

¹CPC: Ciclo produttivo completo

²IC: inizio ciclo

³MC: metà ciclo

⁴FC: fine ciclo

⁵TC: Tamponi cloacali

⁶TT: Tamponi tracheali

⁷NV: Non vaccinati

Tabella 2. Ceppi su cui è stata eseguita l'analisi filogenetica di una porzione dei geni RpRd ed S, specie di origine dei campioni, segni clinici osservati, tipologia di campione e numero di accesso in *GenBank* delle sequenze.

Ceppo	Specie	Segni clinici	Campione	Gene	Genbank Accession number
Quaglie01/TC/All.1	Quaglie	N/S ¹	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077965
Quaglie01/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	S	KX077959
Quaglie06/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077966
Quaglie06/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	S	KX077960
Quaglie21/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077967
Quaglie21/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	S	KX077961
Quaglie22/TT/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Tracheali	RPRD	KX077968
Quaglie22/TT/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Tracheali	S	KX077962
Quaglie38/TC/All.1	Quaglie	Ent ²	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077969
Quaglie11/TT/All.2	Quaglie	Ent	Tamponi Tracheali	RPRD	KX077970
Quaglie11/TT/All.2	Quaglie	Ent	Tamponi Tracheali	S	KX077963
Quaglie30/TC/All.4	Quaglie	Ent	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077971
Quaglie32/TC/All.4	Quaglie	Ent	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077972
Fagiani01/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	RPRD	KX077973
Fagiani02/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	RPRD	KX077974
Fagiani03/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	RPRD	KX077975
Fagiani02/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	S	KX077964

¹N/S: Nessun segno clinico

²Ent: Sintomatologia enterica

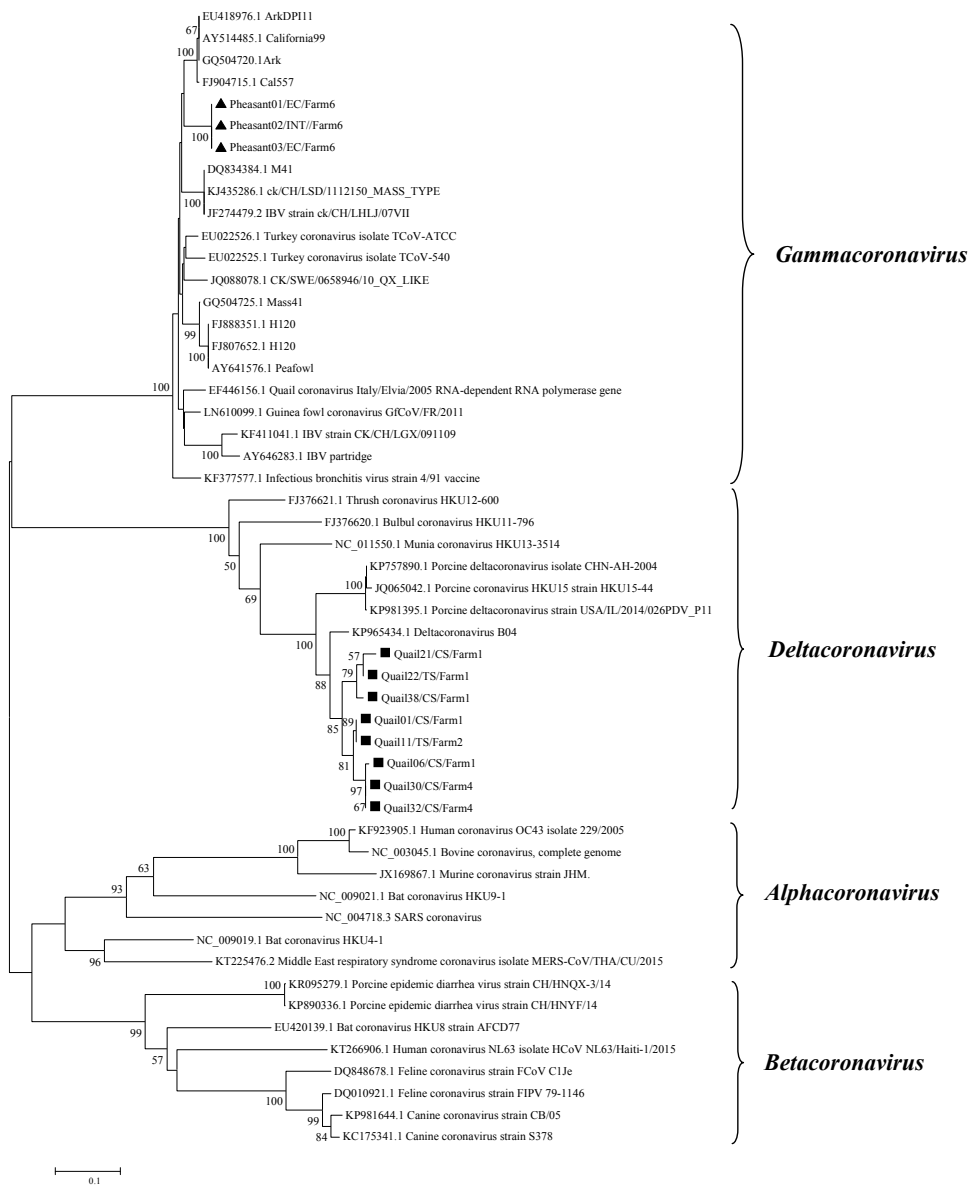


Figura 1. Albero filogenetico, ottenuto con il metodo *Maximum-Likelihood* (ML), basato sulle sequenze nucleotidiche di una porzione del gene RpRd (posizione nt 16179-16543) dei campioni analizzati in questo studio (campioni delle quaglie indicati con un quadrato nero e dei fagiani con un triangolo nero). Il numero riportato accanto ad ogni nodo indica il valore di *bootstrap* (sono riportati solo valori >50). Le barre rappresentano la distanza nucleotidica espressa come numero di mutazioni nucleotidiche per sito.

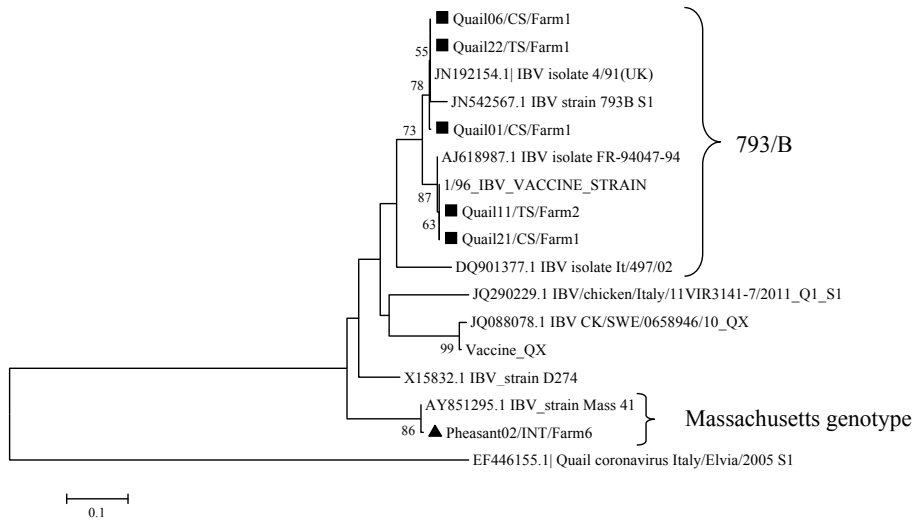


Figura 2. Albero filogenetico, ottenuto con il metodo *Maximum-Likelihood* (ML), basato sulle sequenze di una porzione del gene S (posizione nt 726-1073) dei campioni analizzati in questo studio (campioni delle quaglie indicati con un quadrato nero e dei fagiani con un triangolo nero). Il numero riportato accanto ad ogni nodo indica il valore di *bootstrap* (sono riportati solo valori >50). Le barre rappresentano la distanza nucleotidica espressa come numero di mutazioni nucleotidiche per sito.