

# PICCOLI CAMBIAMENTI, GRANDI BENEFICI: INDAGINE DELL'EFFETTO DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA E DEL METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN GRECIA

Franzo G.<sup>1</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Andreopoulou M.<sup>2</sup>, Prentza Z.<sup>3</sup>, Koutoulis K.C.<sup>3</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Chaligiannis I.<sup>4</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Animal Medicine, Production and Health (MAPS), University of Padua, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

<sup>2</sup> *Centre of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, An den Tierkliniken 35, 04103, Leipzig, Germany*

<sup>3</sup> *Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Thessaly, Trikalon 224, 43100, Karditsa, Greece.*

<sup>4</sup> *Directorate of Veterinary Center of Thessaloniki, Ministry of Rural Development and Food, 26th October Street 80, 54627, Thessaloniki, Greece.*

## Summary

Respiratory diseases like *Infectious bronchitis virus* (IBV) and *Avian metapneumovirus* (aMPV) have been traditionally held accountable for major losses for poultry production. Nevertheless, scarce information was present dealing with the prevalence and molecular epidemiology of these infections in Greece and the efficacy of currently applied control strategies. To fill this gap, a specific epidemiological study was designed. Both IBV and aMPV field strain prevalence was proven high, approximately 20 and 30% respectively, being the GI-19 lineage and subtype B the most commonly detected IBV and aMPV genetic types, respectively. Infection with IBV field strains was significantly associated with clinical signs presence (odds ratio= **8.55**). Remarkably, only the vaccination protocol involving a double vaccination at 1 day of age was proven protective against IBV-induced symptomatology, with the **odds of developing disease being 4.14 times lower**.

No association was demonstrated between aMPV infection and clinical outbreaks or between aMPV and IBV detection, suggesting the marginal role of the former pathogen in poultry farming.

Globally, the present study provides the first detailed investigation of the epidemiological scenario of two viruses traditionally considered of pivotal relevance in poultry farming and demonstrates that remarkable benefits could be obtained just with minor adjustments of the vaccination protocols.

## INTRODUZIONE

Dal 2009, la Grecia ha conosciuto una rilevante crisi economica, che ha portato ad una diminuzione del prodotto interno lordo di circa il 40% nei successivi 7 anni. Anche l'accesso ai beni primari, quali il cibo, è stato condizionato negativamente da questa congiuntura, esitando in una diminuzione significativa del consumo di proteine di origine animale (<http://www.fao.org/faostat/>). Tradizionalmente, il pollame e le uova sono considerate fonti di proteine relativamente economiche e di alto valore biologico. Sebbene la produzione avicola in Grecia sia rimasta sostanzialmente costante nel tempo, i prezzi di produzione sono aumentati del 25% circa

fra il 2009 e il 2014, con ovvie conseguenze sul prezzo al consumatore e sulle abitudini alimentari (<http://www.fao.org/faostat/>). A questo fatto si è prevedibilmente accompagnato il fallimento o accorpamento di molte aziende del settore. Una moltitudine di fattori hanno contribuito alla genesi di questo scenario, inclusa la netta diminuzione degli investimenti in agricoltura, diminuiti da 3856 milioni di Euro nel 2008 a 1412 nel 2012. Sulla base di queste premesse, un ammodernamento del settore, mirato ad una riduzione dei costi di produzione, appare improbabile nel breve-medio periodo. Tuttavia, il perfezionamento della gestione dell'allevamento potrebbe senza dubbio portare a un immediato e significativo miglioramento per la avicoltura e, di riflesso, per la popolazione greca.

Le patologie respiratorie hanno una grande rilevanza economica nell'allevamento avicolo sia a cause delle perdite dirette da esse indotte, sia per i costi associati al loro controllo.

Fra queste, la Bronchite infettiva (BI) si è affermata come una delle patologie più diffuse e dannose, quantomeno in Europa (13). Similmente ad altri virus a singolo filamento di RNA, il virus della bronchite infettiva (IBV) presenta un elevato tasso di mutazione e di ricombinazione. Ciò ha portato all'emergere di diversi genotipi nel corso del tempo (23). In aggiunta, la vasta rete di connessioni internazionali ha favorito la diffusione di questo patogeno, rendendo probabile l'importazione di ceppi con differenti caratteristiche immunologiche (8). Questa grande variabilità genetica e antigenica, a cui si associa una scarsa cross-protezione, ha chiaramente complicato la messa a punto di strategie di controllo, ad oggi fondate principalmente sulla vaccinazione (25). Oltre all'uso di vaccini basati sul ceppo di campo circolante (vaccinazione omologa), molto comune è l'applicazione di una combinazione di vaccini basati su genotipi differenti (vaccinazione eterologa) al fine di aumentare lo spettro di protezione (5). Tuttavia, non può non essere sottolineato come diversi fattori manageriali, quali via di somministrazione, dose, tempistiche e condizioni di accasamento, possano sostanzialmente condizionare l'efficacia della vaccinazione (26). Nonostante questi limiti, quando effettuata in modo adeguato, la vaccinazione si è dimostrata in grado di limitare l'insorgenza di segni clinici e la circolazione virale (10,19). Appare quindi evidente la rilevanza di una dettagliata e aggiornata conoscenza dello scenario epidemiologico locale, al fine di poter calibrare al meglio gli interventi vaccinali, massimizzandone l'efficacia e il rapporto costo-beneficio. Purtroppo, queste informazioni sono mancanti in molti Stati, Grecia inclusa. Le scarse conoscenze epidemiologiche hanno sovente portato ad una scelta dei protocolli vaccinali basata su opinioni personali e consuetudini, piuttosto che su un'oggettiva analisi della realtà.

Sulla base di queste premesse, il presente studio mira ad ottenere una rappresentazione significativa dell'epidemiologia di IBV in Grecia, monitorando nel contempo l'efficacia delle strategie di controllo attualmente impiegate.

Recentemente, alcuni studi hanno evidenziato un potenziale incremento del ruolo di *Avian metapneumovirus* (aMPV) quale agente primario responsabile di episodi di sintomatologia respiratoria nel broiler (22). Sebbene questo patogeno sia stato precedentemente segnalato in Grecia (20), non sono attualmente disponibili informazioni precise sulla sua distribuzione e rilevanza clinica. Conseguentemente, la prevalenza e l'impatto di aMPV sono stati altresì valutati.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Sulla base dell'obiettivo primario dello studio, un minimo di 100 allevamenti doveva essere incluso al fine di stimare la prevalenza di allevamenti positivi per IBV in Grecia con una confidenza del 95% e una precisione del  $\pm 10\%$ , assumendo una prevalenza attesa del 50%. Il campionamento è stato stratificato sulla base del numero di allevamenti presenti nelle tre principali regioni produttive Greche: Epiro (Nord-ovest), Macedonia centrale e Grecia centrale. Si è inoltre cercato di ottenere un campione bilanciato fra allevamenti rurali e intensivi e fra broiler e ovaiole, sulla base delle rispettive frequenze. Da ciascuno degli allevamenti, selezionati in modo casuale, sono stati effettuati 10 tamponi tracheali, successivamente analizzati in un unico pool. Quando disponibili, per ciascun campione sono state raccolte le seguenti informazioni: data di campionamento, geolocalizzazione dell'allevamento, tipologia di allevamento (rurale o intensivo), categoria produttiva (ovaiole o broiler), età degli animali, dimensioni della popolazione, protocollo vaccinale utilizzato nei confronti di IBV e aMPV e, se presenti, tipologia di segni clinici.

### *Diagnosi di IBV e aMPV*

I pool di tamponi sono stati eluiti in 2 mL di PBS. 200 $\mu$ L della soluzione ottenuta sono stati estratti utilizzando il kit High Pure Viral RNA kit (Roche) seguendo le istruzioni del produttore. La diagnosi di IBV è stata effettuata tramite RT-PCR utilizzando i primer XCE-1 e XCE-2 e la metodica descritta da Cavanagh et al. (1999) (2) e gli amplificati ottenuti sono stati sequenziati utilizzando le medesime coppie di primer. La diagnosi e sub-tipizzazione di aMPV è stata effettuata utilizzando la real-time RT-PCR descritta da Franzo et al. (2014) (7). Parte del gene G è stata amplificata a partire dai campioni positivi utilizzando i primer Gstart+ e G6-, secondo il protocollo descritto da Cecchinato et al. (2010) (3), e successivamente sequenziata.

### *Analisi filogenetica*

La genotipizzazione dei ceppi di IBV è stata eseguita comparando le sequenze ottenute con il dataset di riferimento proposto da Valastro et al. (2016) (23). Brevemente, le sequenze sono state allineate utilizzando il programma MAFFT (18) e eventuali ceppi ricombinati sono stati identificati e rimossi utilizzando il software RDP4 (14). L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando il metodo di Maximum Likelihood implementato in PhyML (12). Un approccio comparabile è stato utilizzato per l'analisi filogenetica dei ceppi di aMPV.

### *Analisi statistica*

È stata valutata l'associazione statistica fra la positività a IBV/aMPV e protocolli vaccinali, tipologia produttiva, categoria animale, densità di popolazione, età e presenza di segni clinici. Per permettere una più robusta analisi statistica, i dati sono stati aggregati in un limitato numero di categorie. Più nel dettaglio, le differenti strategie vaccinali sono state riassunte in: "Vaccinazione: Sì/No" e ulteriormente caratterizzate in "Assenza di vaccinazione/ Vaccinazione combinata a 1 gg di vita/ Altri protocolli vaccinali". Similmente i segni clinici sono stati categorizzati come "Presenti/Assenti" e "Assenti/Respiratori/Enterici/Riproduttivi/Altro". Un'ulteriore variabile è stata introdotta per differenziare i ceppi IBV di origine vaccinale e di campo. I ceppi parte

del medesimo cluster e con una percentuale di identità nucleotidica superiore al 99% rispetto ai vaccini impiegati, sono stati classificati come ceppi vaccinali e i restanti come ceppi di campo.

La presenza di differenze statisticamente significative fra gruppi è stata valutata usando il test Chi-quadrato o il test esatto di Fisher nel caso di variabili categoriche, mentre nel caso di variabili continue sono stati utilizzati il t-test di Student o il test di Mann-Whitney. Qualora il confronto interessasse più di due gruppi, si è impiegato il test ANOVA o Kruskal-Wallis, seguiti da test post hoc (t-test o Mann-Whitney) con aggiustamento di Bonferroni per confronti multipli.

Quando appropriato, sono state effettuate delle regressioni logistiche per valutare e quantificare la rilevanza di diverse variabili nell'emergere di segni clinici, calcolando il relativo odds ratio. Il livello di significatività statistico è stato definito a  $p < 0.05$ .

La prevalenza di allevamento e il relativo intervallo di confidenza al 95% è stata calcolato sulla base del metodo asintotico di Wald utilizzando il pacchetto *prevalence* (6) di R. Una stima della prevalenza individuale e il relativo intervallo di confidenza al 95% è stata altresì ottenuta a partire dai risultati dei pool tramite una simulazione Markov Chain Monte Carlo, utilizzando l'approccio Bayesiano implementato nel medesimo pacchetto. A tal fine, una distribuzione uniforme fra 80 e 100% è stata assunta per i valori di sensibilità e specificità del test *a priori*. I valori *a priori* della prevalenza reale sono stati rappresentati da una distribuzione Beta (1,1).

## RISULTATI

### *Background*

Cento e sei allevamenti, 10 rurali e 96 commerciali, sono stati campionati nel periodo Marzo 2016 - Maggio 2017; in 78 allevamenti erano allevati broiler, mentre in 28 ovaiole. La distribuzione geografica degli allevamenti considerati è riportata in Figura 1. La vaccinazione nei confronti di IBV era applicata in 72 allevamenti mentre solamente 5 erano vaccinati per aMPV. Il protocollo vaccinale più comunemente implementato prevedeva una combinazione di Mass (ceppo H120) e 793B (ceppo 1/96). Un minor numero di allevamenti era stato vaccinato solamente con Mass (n=10) o con Mass in combinazione con vaccini basati su ceppi 4/91 (n=4) o QX (n=3).

In 33 allevamenti sono stati osservati i seguenti segni clinici: sintomi respiratori (n=17), riproduttivi (n=2), enterici (n=2) o altri (n=12). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative fra allevamenti commerciali e rurali nella presenza di segni clinici.

### *Epidemiologia di IBV*

Ottantanove allevamenti su 106 sono risultati positivi per IBV, corrispondente a una prevalenza di allevamento = 83.96% [95CI=76.98%-90.95%], mentre la prevalenza individuale stimata è risultata essere del 13% [95HPD 7.7%-19.7%]. Il sequenziamento e l'analisi filogenetica (Figura 2) hanno permesso di dimostrare la circolazione di 4 genotipi caratterizzati da una diversa prevalenza: 69 (65.09%) ceppi 793B, 14 (13.20%) QX, 4 (3.77%) Mass e 1 (0.94%) Ark. Tutti i ceppi Ark e Mass sono stati classificati come ceppi vaccinali, similmente a 65 dei 69 ceppi 793B (i.e. 53 1/96 e 12 4/91). Tutti i ceppi QX sono risultati ceppi di campo. In aggiunta, un ceppo derivante dalla ricombinazione dei genotipi QX e 793B è stato identificato.

Conseguentemente, un totale di 19 ceppi (14 QX, 4 793B e 1 ricombinate) sono sta-

ti classificati ceppi di campo, corrispondenti ad una prevalenza di allevamento del 17.97% [95CI 10.62%-25.22%] e individuale del 1.90% [95HPD 0.10%-4.30%]. Segni clinici sono stati osservati in 12 su 34 allevamenti non vaccinati e in 21 su 72 fra quelli vaccinati. Le differenze rilevate non sono tuttavia risultate statisticamente significative. Similmente, non è stata riscontrata alcuna differenza nella frequenza di ceppi di campo riscontrata in allevamenti vaccinati e non. Per valutare l'effetto delle differenti strategie vaccinali, oltre all'assenza di vaccinazione, sono state introdotte due nuove categorie rappresentative di allevamenti, dove una doppia vaccinazione eterologa è stata somministrata a 1gg di vita e di quelli sottoposti ad altre strategie vaccinali. In questo caso l'odds di sviluppare malattia è risultato 4.14 [95CI 1.34-14.51, p-value=0.017] volte più basso in animali sottoposti ad una vaccinazione combinata ad un giorno di vita. Al contrario, non sono state riscontrate differenze fra gli animali non vaccinati e quelli vaccinati con altri protocolli vaccinali (p-value= 0.12). La presenza di segni clinici è risultata significativamente più alta (odds 8.55 [95CI 2.17-24.90]) in allevamenti dove è stata provata la presenza di ceppi di campo. Altre associazioni fra positività a IBV e altri parametri di interesse (età degli animali, localizzazione geografica, stagione, etc.) non sono state riscontrate.

### *Epidemiologia di aMPV*

Trentadue allevamenti sono risultati positivi a aMPV sottotipo B, corrispondente a una prevalenza di allevamento del 30.18% [95CI 21.45%-38.92%] e individuale del 2.8% (95HPD 0.1%-6%). Tutti i ceppi facevano parte del medesimo cluster filogenetico, che include altresì ceppi italiani e rumeni. Le uniche eccezioni erano rappresentate da due ceppi di aMPV che clusterizzavano con i vaccini NEMOVAC®(Merial) e Nobilis Rhino CV®(MSD), nonostante nessuno dei due allevamenti in esame fosse stato vaccinato nei confronti di aMPV.

La presenza di segni clinici è stata evidenziata in 10 allevamenti infetti su 32 (31,25%), similmente a quanto evidenziato in quelli non infetti (23 su 74; 31.08%). Conseguentemente, nessuna associazione è stata riscontrata fra aMPV e la presenza di sintomatologia. Risultati analoghi sono stati riscontrati considerando solamente la presenza di sintomatologia respiratoria. Nessuna associazione è stata riscontrata fra l'infezione con aMPV e IBV.

## **DISCUSSIONE**

IBV rappresenta una delle principali minacce per l'allevamento intensivo del pollame, causando perdite dirette a causa di mortalità, ridotto accrescimento e diminuzione nella produzione e qualità delle uova (1). In aggiunta, l'aumentata suscettibilità a infezioni secondarie richiede tipicamente degli interventi addizionali che, oltre a pesare negativamente sul bilancio aziendale, sono spesso scoraggiati dalle attuali politiche della comunità europea (e.g. riduzione dell'utilizzo di antimicrobici).

Il presente studio dimostra l'elevata prevalenza di IBV, sebbene la maggior parte degli stipiti identificati risulti di origine vaccinale. Tali risultati non devono sorprendere, considerato l'ampio utilizzo di vaccini vivi attenuati e la capacità di questi di persistere e circolare all'interno degli allevamenti (2,21). La presenza di ceppi vaccinali è tuttavia stata riscontrata anche in allevamenti non vaccinati o vaccinati con differenti protocolli vaccinali, confermando la capacità di questi virus di diffondere a livello locale e influenzare lo scenario epidemiologico, complicandone l'interpretazione (9). Ancor

più rilevante è il riscontro, in un allevamento non vaccinato, di un virus ricombinante i cui stipiti parentali sono risultati riconducibili a ceppi vaccinali QX e 793B. Il diffuso uso della vaccinazione può chiaramente creare condizioni favorevoli per l'instaurarsi di co-infezioni e quindi di ricombinazione. Sebbene questo fenomeno non possa essere sottovalutato, essendo stato frequentemente riscontrato da altri autori (13) ed essendo potenzialmente in grado di portare alla genesi di ceppi caratterizzati da un'elevata fitness (17), il caso qui considerato è risultato un riscontro occasionale ed è quindi probabile che lo stipite ricombinante identificato rappresenti una variante transitoria, caratterizzata da un limitato successo epidemiologico.

Il costo economico associato alla vaccinazione per IBV suggerisce che questa debba essere effettuata solo quando necessaria, ossia qualora: 1) il patogeno sia effettivamente circolante e responsabile di patologia; 2) le vaccinazioni applicate si dimostrino efficaci nel controllo della malattia.

Il presente studio dimostra la diffusa circolazione di ceppi di campo IBV in Grecia, in particolar modo appartenenti al genotipo QX. Questi ceppi sono stati più frequentemente riscontrati in presenza di segni clinici rispetto a quanto prevedibile per il solo effetto del caso, confermandone l'effettivo ruolo come agente primario di malattia. Tuttavia, ad una prima analisi, nessuna differenza significativa è stata riscontrata fra allevamenti vaccinati e non. Questi dati sono risultati assai sorprendenti, in quanto la maggior parte degli allevamenti in Grecia utilizzavano un protocollo di vaccinazione basato sul concetto di "protettotipo" (5), già dimostratosi efficace nel controllo della sintomatologia clinica sia in condizioni di campo che sperimentali (10,11,19). Conseguentemente, altre variabili possono aver influenzato negativamente l'efficacia della vaccinazione. È interessante notare come gli allevamenti dove entrambi i vaccini sono stati somministrati ad un giorno di vita presentassero un odds 4 volte inferiore di sviluppare segni clinici rispetto ad allevamenti non vaccinati. Al contrario, altre strategie vaccinali non sembrano fornire alcun vantaggio e, al contrario, sono state associate ad un odds 2.26 volte superiore di sviluppare malattia rispetto all'assenza di vaccinazione, sebbene tale differenza non sia risultata statisticamente significativa. Tale riscontro potrebbe essere attribuibile a fenomeni di reversione a virulenza o a un maggior danno all'epitelio respiratorio causato dalla replicazione vaccinale, potenzialmente più marcati a causa del minor *coverage* vaccinale e della conseguente prolungata ri-circolazione virale (4,16).

Una vaccinazione combinata potrebbe quindi essere più efficace nel contrastare l'emergere di sintomatologia clinica e i relativi danni, pur non prevenendo la circolazione dei ceppi di campo.

Questi risultati sono in conflitto con l'opinione generale che ritiene vantaggioso un ritardo nella seconda somministrazione vaccinale in quanto questa permetterebbe un recupero della funzionalità epiteliale e garantirebbe un effetto *booster* (15,24). Sebbene ulteriori studi siano necessari per investigare le cause di questo fenomeno, è possibile ipotizzare che la vaccinazione combinata in incubatoio garantisca un maggior *coverage* e miglior controllo sulle condizioni di somministrazione, compensando e superando i vantaggi immunologici e di replicazione attesi nel caso di interventi vaccinali separati. Sulla base di queste evidenze, un miglioramento nel controllo di IBV appare raggiungibile in Grecia semplicemente agendo su un uso più coscienzioso e mirato dei protocolli vaccinali già implementati, senza dover ricorrere a costosi interventi strutturali o a nuove strategie di controllo.

L'analisi dell'epidemiologia di aMPV ha fornito risultati altrettanto interessanti, dimostrando l'elevata prevalenza di questo virus in Grecia, evidenza già riscontrata in Italia. Tuttavia, alcune marcate differenze sono presenti fra i 2 Paesi. Similmente a quanto riportato in Italia (22), circa il 30% degli allevamenti infetti presentavano segni clinici. Tuttavia, in questo caso, il disegno dello studio ha permesso di evidenziare l'assenza di associazione statistica fra l'infezione con aMPV e la presenza di sintomatologia, supportando un ruolo marginale di questo patogeno, quantomeno in Grecia. Infatti, la presenza di aMPV con una frequenza del tutto comparabile in allevamenti sani e sintomatologici suggerisce che la sua identificazione sia probabilmente un riscontro incidentale in presenza di altri agenti eziologici primari.

La co-infezione fra aMPV e IBV è risultata comune; in particolare, il 68% e 28% dei campioni aMPV positivi si è rilevato positivo a ceppi di IBV vaccinali e di campo, rispettivamente. Anche in questo caso, lo scenario descritto è in netto contrasto con quello Italiano, ove solo il 4% dei campioni testati era risultato co-infetto con ceppi di campo. Tuttavia, nessuna interazione statisticamente significativa è stata riscontrata fra IBV e aMPV in termini di frequenza dell'infezione o di emergenza di segni clinici. Vari elementi potrebbero essere adottati per spiegare questi risultati. Deve innanzitutto essere sottolineato come IBV sia attualmente efficacemente controllata in Italia, evidenza che può facilmente giustificare la minor frequenza di co-infezioni. Appare inoltre possibile speculare come l'efficace vaccinazione per IBV possa aver alterato l'equilibrio competitivo fra questi patogeni, a beneficio di aMPV (22). Tuttavia, la mancanza di interazione fra IBV e aMPV qui dimostrata, sembra sconsigliare questa ipotesi. Un'ulteriore e suggestiva ipotesi è la presenza di diverse linee genetiche animali nei 2 Stati, caratterizzate da una variabile suscettibilità a aMPV. Più probabilmente, la combinazione di diversi elementi, comprendenti peculiarità degli stipiti virali, caratteristiche biologiche dell'ospite, fattori manageriali e il disegno sperimentale dello studio, possono aver determinato le differenze osservate.

## **CONCLUSIONI**

Il presente studio fornisce una solida e aggiornata descrizione dell'epidemiologia di IBV e aMPV in Grecia. Lo studio della prevalenza, distribuzione e caratteristiche molecolari di questi patogeni, assieme alla valutazione dell'efficacia delle strategie di controllo attualmente applicate, potranno essere utilizzate per guidare la messa a punto di adeguate politiche sanitarie, permettendo di indirizzare e ottimizzare i futuri investimenti e minimizzare i costi, non solo in Grecia ma anche su una scala più ampia.

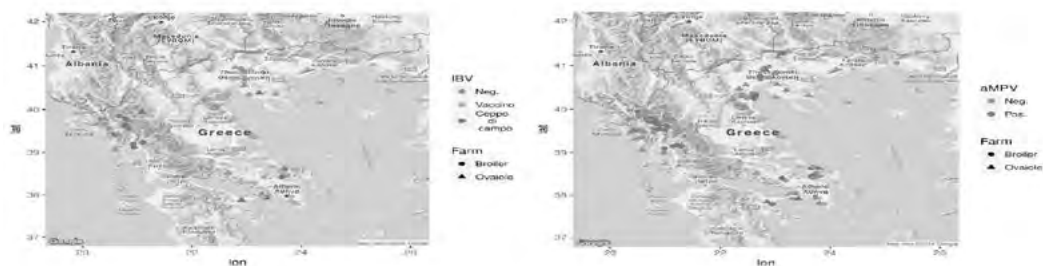
## **BIBLIOGRAFIA**

1. Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38: 281–297. 2007.
2. Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton, and C. J. Naylor. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28: 593–605. 1999.
3. Cecchinato, M., E. Catelli, C. Lupini, E. Ricchizzi, J. Clubbe, M. Battilani, and C. J. Naylor. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Vet. Microbiol.* 146: 24–34. 2010.

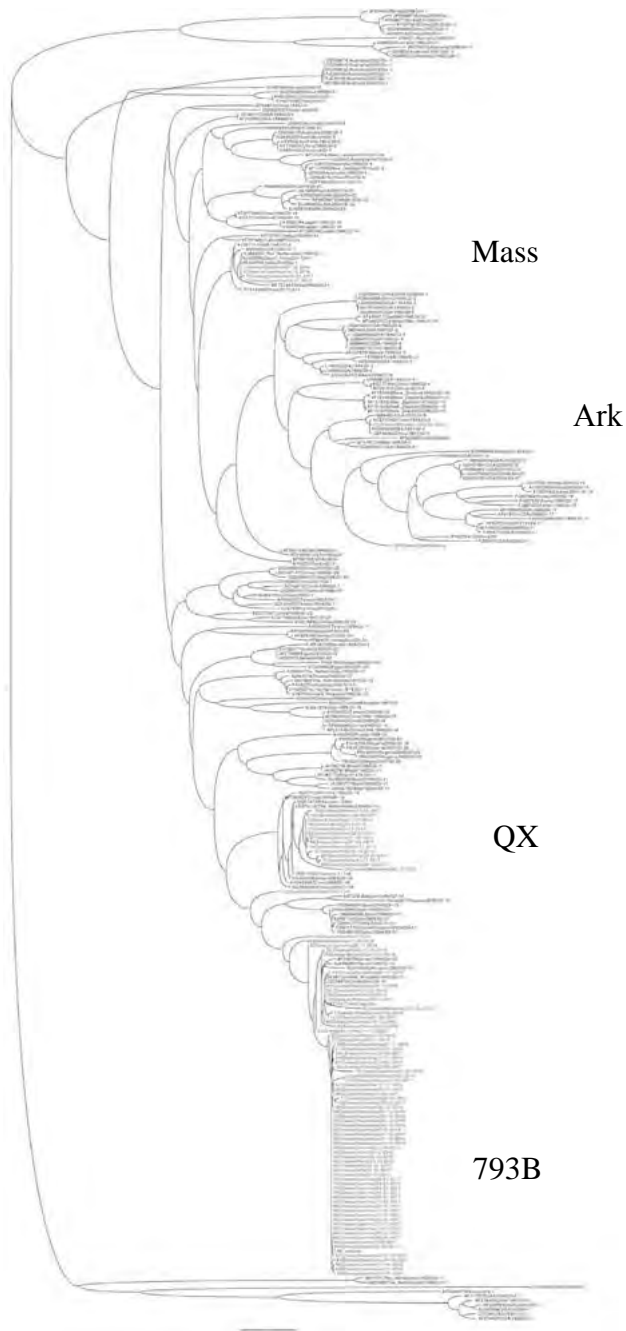
4. Cook, J. K. A., M. Jackwood, and R. C. Jones. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41: 239–250. 2012.
5. Cook, J. K. A., S. J. Orbell, M. A. Woods, and M. B. Huggins. Avian Pathology Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28: 477–485. 1999.
6. Devleeschauwer, B., P. Torgerson, J. Charlier, B. Leveck, N. Praet, P. Dorny, D. Berkvens, and N. Speybroeck. Prevalence: tools for prevalence assessment studies. R Packag. version 0.3. 0. 2014.
7. Franzo, A. A Sensitive, Reproducible, and Economic Real-Time Reverse Transcription PCR Detecting Avian Metapneumovirus Subtypes A and B. *Avian Dis.* 58: 216–222. 2014.
8. Franzo, G., P. Massi, C. M. Tucciarone, I. Barbieri, G. Tosi, L. Fiorentini, M. Ciccozzi, A. Lavazza, M. Cecchinato, and A. Moreno. Think globally, act locally: Phylodynamic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. *PLoS One* 12. 2017.
9. Franzo, G., C. J. Naylor, C. Lupini, M. Drigo, E. Catelli, V. Listorti, P. Pesente, D. Giovanardi, E. Morandini, and M. Cecchinato. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine* 32: 6765–6767. 2014.
10. Franzo, G., C. M. Tucciarone, A. Blanco, M. Nofrías, M. Biarnés, M. Cortey, N. Majó, E. Catelli, and M. Cecchinato. Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34: 5670–5676. 2016.
11. Geerligs, H. J., G.-J. Boelm, C. A. M. Meinders, B. G. E. Stuurman, J. Symons, J. Tarres-Call, T. Bru, R. Vila, M. Mombarg, K. Karaca, W. Wijmenga, and M. Kumar. Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathol.* 40: 93–102. 2011.
12. Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307–321. 2010.
13. Jackwood, M. W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Dis.* 7: 634–641. 2012.
14. Martin, D. P., B. Murrell, M. Golden, A. Khoosal, and B. Muhire. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1: 1–5. 2015.
15. Di Matteo, A. M., M. C. Sonez, C. M. Plano, and I. von Lawzewitsch. Morphologic observations on respiratory tracts of chickens after hatchery infectious bronchitis vaccination and formaldehyde fumigation. *Avian Dis.* 44: 507–518. 2000.
16. McKinley, E. T., D. A. Hilt, and M. W. Jackwood. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 26: 1274–1284. 2008.
17. Moreno, A., G. Franzo, P. Massi, G. Tosi, A. Blanco, N. Antilles, M. Biarnes, N. Majó, M. Nofrías, R. Dolz, D. Lelli, E. Sozzi, A. Lavazza, and M. Cecchinato.



- A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. *Avian Pathol.* 46: 1–28. 2016.
18. Standley, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.(outlines version 7). *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780. 2013.
  19. Terregino, C., A. Toffan, M. S. Beato, R. De Nardi, M. Vascellari, A. Meini, G. Ortali, M. Mancin, and I. Capua. 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. 2008.
  20. Tucciarone, C. M., M. Andreopoulou, G. Franzo, Z. Prentza, I. Chaligiannis, and M. Cecchinato. First Identification and Molecular Characterization of Avian metapneumovirus Subtype B from Chickens in Greece. *Avian Dis.* 61. 2017.
  21. Tucciarone, C. M., G. Franzo, G. Berto, M. Drigo, G. Ramon, K. C. Koutoulis, E. Catelli, and M. Cecchinato. Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-Time RT-PCR quantification. *Poult. Sci.* 97. 2018.
  22. Tucciarone, C. M., G. Franzo, C. Lupini, C. T. Alejo, V. Listorti, G. Mescolini, P. E. Brandão, M. Martini, E. Catelli, and M. Cecchinato. Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 2017.
  23. Valastro, V., E. C. Holmes, P. Britton, A. Fusaro, M. W. Jackwood, G. Cattoli, and I. Monne. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 39: 349–364. 2016.
  24. Winterfield, R. W., and A. M. Fadly. Some Characteristics of Isolates of Infectious Bronchitis Virus from Commercial Vaccines. *Avian Dis.* 16: 746–+. 1972.25. De Wit, J. J., J. K. a Cook, and H. M. J. F. van der Heijden. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40: 223–35. 2011.
  26. De Wit, J. J., W. A. J. M. Swart, and T. H. F. Fabri. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the alpha-IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. *Avian Pathol.* 39: 123–31. 2010.



**Figura 1.** Mappa riportante la localizzazione degli allevamenti di broiler (cerchio) e ovaiole (triangolo). Gli allevamenti sono stati colorati sulla base della positività a IBV (sinistra) e aMPV (destra). Nel caso di IBV viene riportata anche la distinzione fra ceppi di campo e vaccinali.



**Figura 2.** Albero filogenetico ricostruito con il metodo di Maximum likelihood al fine di comparare le sequenze parziali della regione S1 ottenute nel presente studio (evidenziate in rosso) con le referenze proposte da Valastro et al.,2016 (23).