

GENOTIPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE CIRCOLANTI NEGLI ALLEVAMENTI AVIARI NEL 2018

Trogu T., Faccin F., Canziani S., Lelli D., Sozzi E., Lavazza A., Moreno A.

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

Summary

Avian infectious bronchitis (IB) is a highly contagious viral disease caused by a *Coronavirus* (IBV). It is considered an important cause of economic losses in the poultry industry affecting primarily the respiratory tract but potentially spreading to other organs. The high mutation and recombination rate of IBV has led to the emergence of several new variants that contribute to incomplete protection by current vaccines. In this study we investigate different genotypes in poultry farms with different types of productions characterized by absence of IB clinical symptoms. In January and February 2018, in North Italy, 190 pool of 10 tracheal swabs each one have been analyzed by RT-PCR and successively sequenced. Genotypes 793B, QX and M41 are the most observed, with a total prevalence of 62%. Genotypes recognized are in agreement with current vaccines used, but only a part of samples has a complete identity with the vaccine sequence. This partial variance and the presence of 22% of mixed sequences suggest a potential modification of the virus that could led to clinical symptoms and economic losses.

INTRODUZIONE

La bronchite infettiva aviare è una patologia del pollo a diffusione mondiale, caratterizzata da lesioni a carico degli apparati respiratorio, riproduttivo e dei reni. Questa patologia è soprattutto presente nei paesi in cui l'industria avicola è altamente sviluppata e determina notevoli perdite economiche, legate fondamentalmente alla scarsa crescita, al peggioramento dell'indice di conversione, all'aumento del numero di scarti e di mortalità nei broilers, al calo dell'ovodeposizione e alla minore qualità dell'uovo nelle ovaiole e nei riproduttori. Il virus della Bronchite Infettiva (IBV) appartiene alla famiglia *Coronaviridae* e, insieme a quello del tacchino e del fagiano, viene inquadrato nel genere *Gammacoronavirus*. E' caratterizzato da un'elevata variabilità antigenica riconducibile fondamentalmente alle modificazioni che si verificano a carico di una sola proteina strutturale, la proteina S degli spikes, e in particolare della S1, una delle due sub-unità che la compongono. A partire del 1956 (3), si sono progressivamente identificati nuovi sierotipi o varianti di IBV nei vari continenti e a oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi, anche se si pensa che solo una piccola parte di quelli esistenti sia stata individuata. La continua comparsa di nuove varianti IBV avviene malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti contenenti singole varianti (M41, 793B, QX) o associazioni tra di esse. La mancanza di una protezione vaccinale completa determina in molti casi la comparsa di forme cliniche sempre più variabili che vanno dalle respiratorie o renali, più frequenti nei broilers, a

quelle caratterizzate da calo di ovodeposizione e alterazione della qualità del guscio, tipiche di ovaiole e riproduttori. Il frequente riscontro di nuove varianti antigeniche può quindi rendere problematica la realizzazione di adeguate profilassi immunizzanti e, per questo motivo, le indagini epidemiologiche indirizzate alla caratterizzazione dei ceppi IBV, isolati in ogni territorio, risultano di notevole importanza nella scelta di programmi vaccinali in grado di conferire una buona protezione.

Lo scopo di questo lavoro è indagare i genotipi IBV circolanti in animali vaccinati senza sintomatologia respiratoria appartenenti a diverse tipologie produttive, allo scopo di meglio comprendere la diffusione del virus IBV negli allevamenti vaccinati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati analizzati 190 pool di 10 tamponi tracheali ciascuno, raccolti da allevamenti siti nelle province di Bergamo, Brescia, Cremona, Mantova e Lodi nei mesi di Gennaio-Febbraio 2018. I campioni sono stati raccolti da animali senza sintomatologia respiratoria che provenivano da allevamenti di diverse tipologie produttive, ovaiole (18,8%), broiler (73%), riproduttori (3,8%) e svezzatori (4,4%).

Analisi filogenetica e molecolare e isolamento virale

L'RNA totale è stato estratto utilizzando trizol reagent (Invitrogen, USA) come da istruzioni. L'RNA così estratto è stato sottoposto a reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (1) del virus, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®). Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 7 utilizzando il metodo neighbour-joining, modello Kimura 2 parametri. Le topologie evidenziate sono state confermate con i metodi maximum likelihood e maximum parsimony.

RISULTATI

La RT-PCR eseguita direttamente sui tamponi tracheali ha evidenziato una positività per IBV in 118 campioni (62%). Nel grafico 1 vengono riportati i campioni analizzati divisi per risultato e per tipologia produttiva.

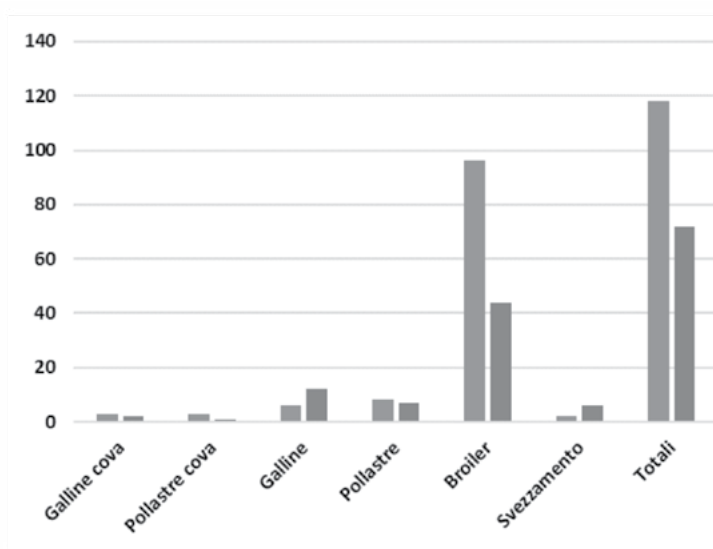


Grafico 1: N. di campioni testati divisi per tipologia produttiva e per risultato alla RT-PCR per IBV

Confrontando le diverse tipologie produttive si può notare come i broiler rappresentino la categoria con una percentuale più alta di positività. La tendenza, anche nelle altre tipologie di allevamento, è quella di avere una percentuale di positività maggiore rispetto ai campioni negativi.

Per dare un'idea grafica della divisione tra campioni positivi e negativi in ogni tipologia produttiva si riporta il grafico 2.

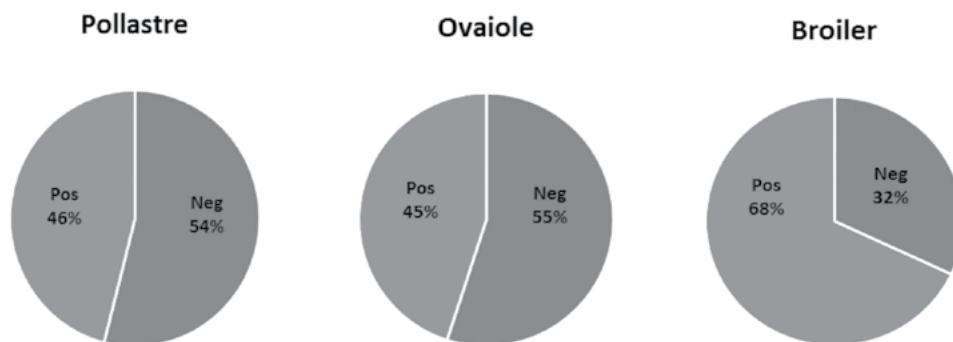


Grafico 2: Percentuale di campioni negativi e positivi IBV per tipologia produttiva

I genotipi più frequentemente osservati sono stati il 793B (1/96 incluso) e il QX con percentuali del 56% e 27% rispettivamente (Grafico 3 e 4). Altro genotipo identificato, seppur con percentuale minore è M41 (Massachusetts). Da rilevare la assenza di genotipi quali Guangdong/Xindadi e 624I/Q1 che con percentuali variabili venivano rilavati tutti gli anni. Si conferma l'assenza del genotipo IT02 molto frequente negli anni 2000.

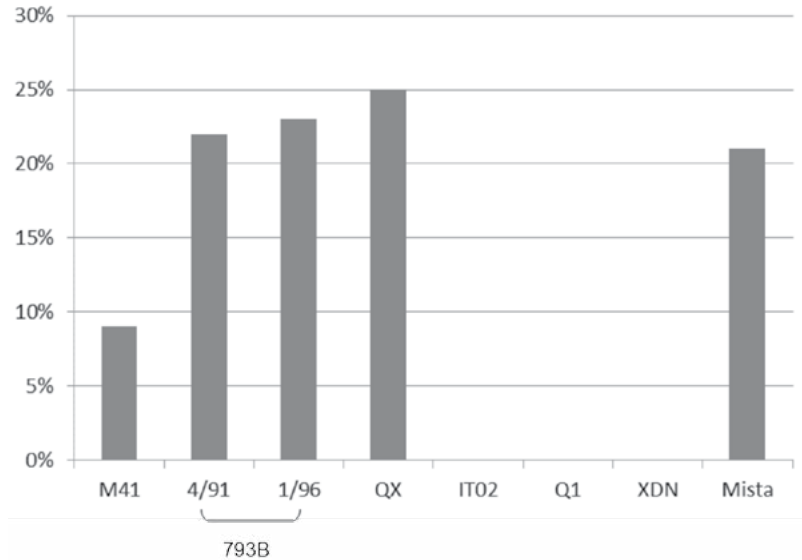


Grafico 3: Percentuale di genotipi rilevati

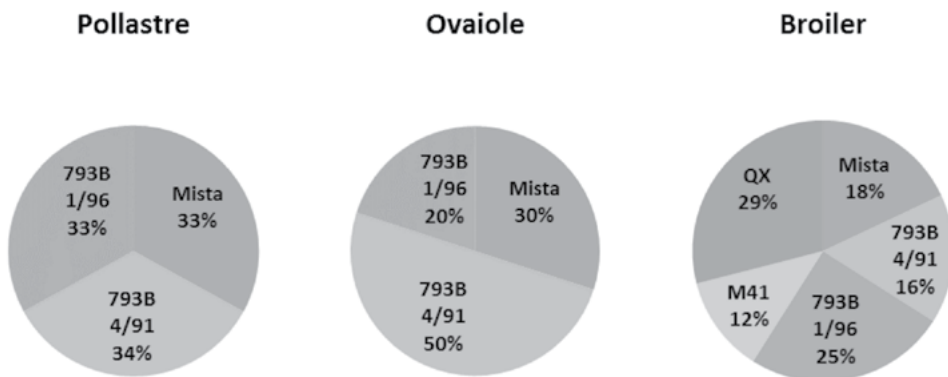


Grafico 4: Percentuali di genotipi rilevati nelle diverse tipologie di allevamento

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati delle presenti analisi hanno evidenziato una prevalenza piuttosto elevata di IBV negli allevamenti avicoli (62%), coinvolgendo tutte le tipologie produttive. Tuttavia, scorporando il dato, tale evidenza emerge soprattutto negli allevamenti vocati alla produzione di carne, che presentano il 68% di positività contro il 45-46% rilevato negli allevamenti di ovaiole e pollastre. Questo dato è presumibilmente riconducibile all'entità del campionamento: 140 pool di tamponi trachali effettuati sui broiler.

I genotipi riscontrati più frequentemente (793B, QX e M41) sono espressione dei piani vaccinali attualmente in vigore ed effettuati regolarmente nell'area di studio. Il genotipo M41 è stato isolato in percentuale nettamente minore rispetto a 793B e QX. Il suo riscontro è avvenuto solo nei broiler, mentre si registra l'assenza sia nelle ovaiole che nelle pollastre. Questo risultato può essere messo in relazione con i cicli piuttosto lunghi negli allevamenti di produzione uova che talvolta non permettono l'identificazione tardiva del virus.

Il sequenziamento ha permesso di confrontare gli isolati con i ceppi vaccinali attualmente in uso. Nello specifico il 64% delle sequenze riferibili al genotipo 793B raggiunge una perfetta concordanza con i corrispondenti ceppi vaccinali, in misura del 53% per i ceppi riferibili a 4/91 e del 74% per il 1/96. Per quanto riguarda il genotipo QX, il 48% delle sequenze isolate presenta il 100% di identità con il ceppo vaccinale di riferimento. La restante parte delle sequenze presenta una percentuale di identità con il genotipo vaccinale inferiore al 99,7%. Tra le sequenze analizzate, il 22% è rappresentato da sequenze miste nelle quali non è stato possibile identificare un singolo genotipo. Questo potrebbe indicare la coesistenza di ceppi vaccinali e ceppi di campo all'interno del medesimo allevamento. La non perfetta concordanza tra le sequenze isolate e quelle dei ceppi vaccinali, potrebbe indicare una iniziale fase di mutazione puntuale del virus. Considerando che mutazione e ricombinazione rappresentano caratteristiche distintive del genoma virale, la presenza di ceppi diversi nello stesso allevamento (compresi quelli di campo) può favorire l'insorgenza di nuove varianti con diversa patogenicità e virulenza, che potrebbero esitare nella comparsa di forme cliniche e conseguenti perdite economiche.

In conclusione, monitorare costantemente la presenza e la tipologia dei genotipi circolanti negli allevamenti, permette una corretta valutazione della profilassi vaccinale effettuata e fornisce quindi gli strumenti per tenere sotto controllo l'evoluzione e la diffusione del virus.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and Naylor CJ. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28:593-605.
2. Ji J, Xie J, Chen F, Shu D, Zuo K, Xue C, Qin J, Li H, Bi Y, Ma J and Xie Q. (2011). Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009. *Virol J.* 8:184
3. Jungherr EL, Chromiak TW and Luginbuhl RE. (1956). Immunological differences in strains of Infectious bronchitis. Proc. 6th Ann. Meet. USLSA, 203-205.

4. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuve P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-2463
5. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
6. Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH and Jackwood MW. (2011). Recombination in Avian Gamma-Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Viruses* 3: 1777-1799.