

IMPATTO DELLE STRATEGIE VACCINALI SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV) NEL CONTESTO ITALIANO

Legnardi M., Franzo G., Tucciarone C. M., Drigo M., Cecchinato M.

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

Summary

A retrospective study was performed on infectious bronchitis virus (IBV) positive samples collected in the period 2012-19 in broiler farms in Northern Italy. The considered farms faced a change in the adopted vaccination protocol at the beginning of 2015, shifting from a combination of Mass and 793B vaccines to the administration of Mass and QX ones. The aim of this study was to evaluate the impact of vaccination changes on IBV epidemiology and molecular diagnosis.

In the considered period, the most frequently detected lineages were QX (70%), 793B (16%) and Mass (12%), with sporadic detections of Q1, D274 and recombinant strains. The relative frequencies of QX and 793B detections remained constant after the vaccination change, while a significant rise was observed in Mass detections after the introduction of QX homologous vaccines. Rather than to an increase in Mass population size, this phenomenon may be caused by the different interactions that Mass vaccines have with 793B and QX-based vaccines, the former possibly hindering the detection of Mass strains more easily than the latter. While further studies seem necessary to shed light on this complex subject, the herein presented data seem to suggest that the adopted vaccination should be taken into account to aptly choose the more informative diagnostic assays and properly interpret the results and IBV epidemiology.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva (IBV), responsabile di diverse forme cliniche raggruppate sotto il nome di bronchite infettiva (BI), rappresenta una delle minacce di maggior rilevanza sia sanitaria che economica per l'avicoltura mondiale. Essendo un virus a ssRNA+, IBV è caratterizzato da una notevole variabilità genetica, la quale determina la continua comparsa di nuove varianti tra cui esistono differenze in termini di tropismo, patogenicità, localizzazione geografica e nel livello di cross-protezione garantito nei confronti di altri ceppi (Valastro et al., 2016).

Nonostante i vaccini vivi attenuati, che rappresentano uno strumento essenziale per un efficace controllo della sintomatologia, siano utilizzati routinariamente negli allevamenti intensivi, il loro utilizzo non è esente da svantaggi. Ceppi di origini vaccinale possono diffondersi a popolazioni non vaccinate, oltre a poter andare sporadicamente incontro a fenomeni di rivirulentazione o di ricombinazione con ceppi di campo (Jackwood and Lee, 2017; Moreno et al., 2017). La pressione immunologica determinata dalla vaccinazione sembra inoltre contribuire all'incremento del tasso di mutazione di IBV (Jackwood et al., 2012). Ciononostante, l'impatto che essi hanno sull'epidemiologia di IBV viene scarsamente tenuto in considerazione.

Per valutare come cambiamenti nelle strategie vaccinali possano modificare l'epide-

miologia molecolare di IBV, uno studio retrospettivo è stato condotto su campioni prelevati nell'arco di sette anni in allevamenti di broiler appartenenti ad un'unica filiera produttiva, oggetto nel 2015 di una modifica nel piano vaccinale nei confronti di IBV.

MATERIALI E METODI

Lo studio retrospettivo ha preso in considerazione un totale di 491 *pool* di campioni, prelevati tra il giugno 2012 ed il maggio 2019 in allevamenti di broiler nel Nord Italia. Tra la fine del 2014 e l'inizio del 2015, in tali allevamenti è stato introdotto un vaccino basato sul *lineage* GI-19 (QX), che ha sostituito la vaccinazione basata sul *lineage* GI-13 (793B) adottata fino a quel momento. L'impiego di vaccini basati sul *lineage* GI-1 (Mass) è invece rimasto costante durante l'intero periodo considerato.

I campioni sono stati inclusi sulla base della positività per IBV ad uno screening preliminare condotto tramite qRT-PCR (Virus-IBV-kit (Gensig, Southampton, UK)). Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a RT-PCR usando i *primer* descritti da Cavanagh et al. (1999) ed a sequenziamento con metodo Sanger di una porzione della regione ipervariabile del gene S1. Solo i campioni per cui era disponibile una sequenza di qualità sufficiente a permetterne la genotipizzazione sono stati inclusi nello studio. La distinzione tra ceppi vaccinali e di campo è stata effettuata tramite comparazione con ceppi vaccinali di referenza, allineando le sequenze e misurandone la *p-distance* relativa alla regione sequenziata con il software MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Per l'analisi statistica dei dati, il livello di significatività è stato fissato a $P < 0.01$. La frequenza delle positività per i vari ceppi prima e dopo il cambio di strategia vaccinale è stata confrontata utilizzando il test chi quadrato di Pearson con correzione di Yates.

RISULTATI

Dei 491 campioni totali, 12 risultavano prelevati nel 2012, 61 nel 2013, 45 nel 2014, 192 nel 2015, 119 nel 2016, 42 nel 2017, 10 nel 2018 e 10 nel 2019.

I *lineage* più frequentemente ritrovati sono stati QX (70,2%), 793B (16,5%) e Mass (12,2%), con sporadici ritrovamenti di ceppi appartenenti ai *lineage* GI-16 (Q1) (1%), GI-12 (D274) (0,6%) e di ceppi ricombinanti (0,5%).

Il numero di positività relative ai vari *lineage* riscontrate in ciascun anno sono elencate in **tabella 1**.

Lineage	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	TOTALE
QX	7	38	38	141	83	19	8	6	340
793B	5	14	3	32	17	8	0	2	81
MASS	0	6	3	16	16	15	2	2	60
Q1	0	3	0	2	0	0	0	0	5
D274-like	0	0	1	1	1	0	0	0	3
ceppi ricombinanti	0	0	0	0	2	0	0	0	2
TOTALE	12	61	45	192	119	42	10	10	491

Tabella 1. Numero di positività totali e per ciascun *lineage* riscontrate annualmente.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti permettono di trarre alcune conclusioni generali sull'epidemiologia di IBV in Italia. Già ad una veloce analisi risulta evidente come QX sia stato il *lineage* di maggior rilevanza in Italia nell'ultimo decennio. QX è ritenuto responsabile della maggioranza dei casi clinici osservati in Italia nel periodo considerato (Franzo et al., 2017). Altri risultati degni di menzione sono l'assenza di identificazioni di ceppi Q1 negli ultimi quattro anni, e l'identificazione, limitata a due casi nel 2016, di ceppi riconosciuti come il risultato di eventi di ricombinazione tra ceppi 793B e QX (Moreno et al., 2017).

Passando alla valutazione dell'impatto del cambio di strategia vaccinale sull'epidemiologia di IBV, data la notevole difformità nel numero di campioni disponibili nei diversi anni, per ottenere risultati più robusti si è deciso di dividere il periodo considerato in tre intervalli: gli anni 2012-14, in cui il protocollo vaccinale prevedeva la somministrazione di vaccini Mass e 793B; l'anno 2015, in cui si è effettuata la transizione da vaccini 793b a quelli basati su QX; ed il periodo 2016-19, in cui sono stati impiegati vaccini Mass e QX.

Le differenze in termini di percentuali relative dei ceppi identificati nei diversi intervalli è descritta nel **Grafico 1**.

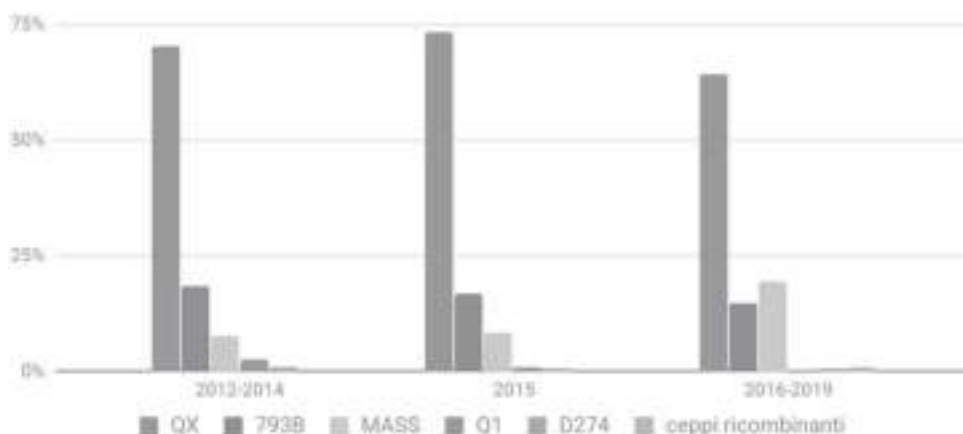


Grafico 1. Frequenza relativa di identificazione dei diversi *lineage* di IBV nei diversi periodi considerati.

La percentuale di ceppi appartenenti ai *lineage* QX e 793B si è mantenuta pressoché costante durante l'intero periodo considerato. A cambiare è presumibilmente l'origine dei ceppi: i ceppi identificati come QX prima dell'introduzione della vaccinazione omologa erano infatti esclusivamente ceppi di campo, mentre successivamente la maggioranza dei ceppi ritrovati aveva origine vaccinale.

Diverso il discorso per quando riguarda il ritrovamento di stipiti 793B: tutti i ceppi ritrovati sono risultati infatti di origine vaccinale, anche successivamente all'inter-

ruzione dell'uso di vaccini basati su questo *lineage*. Sebbene siano necessari ulteriori studi per determinare le ragioni alla base di questo ritrovamento, è possibile ipotizzare che ciò sia dovuto alla persistente circolazione di ceppi 793B all'interno del singolo allevamento e tra allevamenti diversi. Va infatti ricordato come altre filiere e allevamenti abbiamo continuato ad utilizzare vaccini basati sul genotipo 793B, determinandone una continua reintroduzione sul territorio.

Un aumento relativo si è osservato invece nel numero di ritrovamenti di ceppi Mass, tutti di origine vaccinale, nonostante l'utilizzo dei vaccini basati su questo *lineage* fosse rimasto invariato per tutto il periodo considerato. L'aumento nella frequenza di ritrovamenti di Mass nel periodo 2016-19 è infatti statisticamente significativa rispetto a quanto riscontrato sia nell'intervallo 2012-14 che nell'anno 2015. Una spiegazione a questo dato va presumibilmente ricercata nell'interazione tra i diversi vaccini utilizzati e nella natura della metodica effettuata per l'analisi. Nonostante la compresenza di più ceppi di IBV sia una condizione assolutamente comune per via della somministrazione di molteplici vaccini, tramite saggi di RT-PCR generici e successivo sequenziamento è infatti possibile rilevare la presenza di un solo ceppo, generalmente quello prevalente o quello con maggior affinità per i *primer* utilizzati. Si può dunque presumere che la differenza nel numero di ceppi Mass osservati prima e dopo il 2015 non sia adducibile ad una diversa dimensione della popolazione virale appartenente a questo *lineage*, bensì al fatto che la presenza di ceppi vaccinali Mass venga rilevata meno frequentemente con questa metodica, utilizzata per l'intero periodo di studio, quando co-somministrati con vaccini 793B rispetto che con vaccini basati su QX. Si è infatti osservato che in caso di co-somministrazione i vaccini basati su 793B sembrano caratterizzati da una maggior persistenza rispetto a quelli Mass (Tucciarone et al., 2018), che ne faciliterebbe quindi l'identificazione qualora il campionamento venisse eseguito dopo il ventesimo giorno d'età, come avvenuto per pressoché tutti i campioni considerati in questo studio. Al contrario, quando co-somministrati i vaccini basati su Mass sembrano caratterizzati da una maggiore persistenza e replicazione dei vaccini QX (Russo et al., 2016).

CONCLUSIONI

I dati presentati sembrano confermare come la scelta del protocollo vaccinale contro IBV possa avere significativi effetti pratici sull'epidemiologia molecolare di questo virus e conseguentemente sulla sua diagnosi, per cui le metodiche basate su PCR rappresentano uno strumento essenziale. La conoscenza dei vaccini utilizzati risulta quindi indispensabile per decidere quali saggi diagnostici utilizzare e per una corretta interpretazione dei risultati e dell'epidemiologia di IBV. Inoltre, dato che il controllo di IBV prevede sempre più comunemente la combinazione di due o più vaccini vivi basati su diversi ceppi, è evidente come studi che facciano luce sulle loro interazioni risultano sempre più necessari.

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. Franzo G, Tucciarone CM, Blanco A, Nofrarias M, Biarnés M, Cortey M,

- Majó N, Catelli E and Cecchinato M. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34: 5670–5676.
3. Jackwood MW, Hall D and Handel A. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1305–1311.
 4. Jackwood MW and Lee D-H. (2017). Different evolutionary trajectories of vaccine-controlled and non-controlled avian infectious bronchitis viruses in commercial poultry. *PLoS One* 12:e0176709.
 5. Kumar S., Stecher G and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870–1874.
 6. Moreno A, Franzo G, Massi P, Tosi G, Blanco A, Antilles N, Biarnes M, Majó N, Nofrarias M, Dolz R, Lelli D, Sozzi E, Lavazza A, Cecchinato M. (2017). A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. *Avian Pathol.* 46, 28–35.
 7. Russo E, Franzo G, Tucciarone CM, Longoni C and Cecchinato M. (2016). Evidenze di campo dell'efficacia della vaccinazione per Bronchite infettiva con ceppi Mass e QX nei confronti dell'infezione da ceppi di campo di genotipo Q1. 227-232. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria - I Simposio Scientifico SIPA - Parma, Italy, pp 227-232.
 8. Tucciarone CM, Franzo G, Berto G, Drigo M, Ramon G, Koutoulis KC, Catelli E, Cecchinato M. (2018). 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: 303–312.