

## DIFFUSIONE E GENOTIPIZZAZIONE DI *CORONAVIRUS* NEGLI UCCELLI SELVATICI

Trogu T.<sup>1</sup>, Canziani S.<sup>1</sup>, Parisio G.<sup>1</sup>, Lelli D.<sup>1</sup>, Sozzi E.<sup>1</sup>, Barbieri I.<sup>1</sup>, Grilli G.<sup>1</sup>, Chiari M.<sup>2</sup>, Lavazza A.<sup>1</sup>, Moreno A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Via Bianchi 7-9, 25124, Brescia

<sup>2</sup>Regione Lombardia – D.G. Welfare U.O. Veterinaria, Piazza Città di Lombardia, 1, Milano

### Summary

Wild birds could represent a natural reservoir of different pathogens, because of their biological and ethological characteristics. Among potentially dangerous pathogens for avian poultry, wild birds can transmit coronaviruses, in particular *Gamma* and *Deltacoronavirus*. These viruses mostly affect *Ciconiiformes*, *Pelecaniformes* and *Anseriformes*. Aim of the study is to investigate about diffusion and identification of *Coronavirus* genotypes within wild birds' population from Lombardy. During the biennium 2018-2019, 92 pools of faeces from *Anatidae* and 115 pools of viscera from birds of different species, have been collected and analysed through nested PCR. Results highlight a low prevalence of 3.1% (n=6 positive samples from *anatidae*) and phylogenetic analyses show the belonging of isolates to *Gammacoronavirus* group, demonstrating genetic diversity from infectious bronchitis virus (IBV). The low prevalence recorded is likely related to a low risk of transmission of Coronavirus to avian poultry. However, circulation among bird belonging to different orders, besides *Anseriformes*, should be deepened. Indeed, viscera could not represent the ideal biological matrices to isolate *Coronavirus*, thus an underestimation of this infection in wild bird cannot ruled out.

### INTRODUZIONE

Gli uccelli selvatici rappresentano spesso il serbatoio naturale di patogeni di diversa natura. Il motivo risiede sicuramente nella grandissima varietà di specie conosciute, ma soprattutto nelle loro caratteristiche etologiche. La capacità di percorrere lunghe tratte migratorie e la formazione di grandi assembramenti durante gli spostamenti e nelle zone di sosta, permette la veloce diffusione e trasmissione di agenti patogeni sia a livello intraspecifico che interspecifico, anche in vaste aree geografiche. In queste caratteristiche risiede l'importanza del monitoraggio sanitario di tali specie, soprattutto in un'ottica di prevenzione riguardo all'introduzione di patologie potenzialmente zoonosiche e dannose per l'attività zootecnica avicola (Milek et al. 2018). Sicuramente per quest'ultima l'esempio più eclatante è rappresentato dall'influenza aviaria, ma negli ultimi anni si è posta una maggiore attenzione anche ad altri agenti virali in grado di provocare ingenti perdite economiche negli allevamenti. E' il caso dei virus appartenenti alla famiglia *Coronaviridae*, tra i quali riveste particolare importanza il virus della bronchite infettiva (IBV). Al momento i coronavirus sono distinti in 4 generi: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e il recente *Deltacoronavirus* (Chu et al, 2011). I primi due generi sono riferibili ai mammiferi, mentre *Gamma* e *Deltacoronavirus* risultano spesso associati agli

uccelli, che ne rappresentano il maggiore serbatoio, ma sono inoltre stati identificati in alcuni mammiferi marini e carnivori e nei suini in Asia (Dong et al, 2008; Mihindikulasuriya et al, 2008; McCluskey et al, 2016). Sono virus caratterizzati da un elevato tasso di mutazione e ricombinazione durante le fasi di replicazione, e quindi frequentemente soggetti alla formazione di nuove varianti genotipiche. Tali modifiche, oltre a incidere su virulenza e tropismo, potrebbero permettere ai diversi stipiti di adattarsi più facilmente a nuove specie (Woo et al, 2006). Studi precedenti hanno dimostrato come negli uccelli le infezioni da *Gamma* e *Deltacoronavirus* siano generalmente caratterizzate da un andamento asintomatico, permettendo l'insorgenza di alcuni endemismi all'interno di determinate popolazioni aviarie (Chu et al, 2011). Gli ordini maggiormente interessati da tale infezione sono *Ciconiiformes*, *Pelecaniformes* e *Anseriformes*, e generalmente si osserva una prevalenza maggiore di *Gammacoronavirus*. L'infezione da parte di entrambi i generi virali è stata osservata solo negli anseriformi, e, al momento, i dati supportano l'ipotesi che le altre specie possano infettarsi solo con uno dei due generi (Chu et al, 2011). Scopo del lavoro è rilevare la prevalenza di coronavirus sia nella popolazione di anatidi, sia in specie di uccelli selvatici provenienti da diverse aree geografiche della Lombardia; definire i genotipi circolanti al fine di approfondire il ruolo epidemiologico dell'avifauna nella diffusione di tali virus.

## MATERIALI E METODI

### Campionamento

Nel corso del 2018, fino a marzo del 2019, sono stati analizzati 191 campioni fecali di anatidi raccolti dal terreno, raggruppati in 92 pool e 115 pool di visceri (encefalo, trachea, polmone, cuore, milza, rene, intestino) provenienti da volatili selvatici. Tali campioni sono stati originariamente conferiti presso l'IZSLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna) per le analisi inerenti il piano di monitoraggio dell'Influenza aviaria e del virus della West Nile. Nello specifico i campioni fecali rientravano in un programma di monitoraggio all'interno di parchi e aree protette, per lo più delle province di Bergamo, Brescia, Cremona, Lecco, Lodi, Milano, Monza-Brianza e Pavia. Le carcasse invece, provenivano dai centri di recupero degli animali selvatici situati a Vanzago (MI) e Valpredina (BG), a eccezione di una carcassa di Germano reale rinvenuta in provincia di Brescia. L'elenco e il dettaglio della provenienza delle specie analizzate è riportato nella tabelle 1, 2 e nel grafico 1.

PROVINCIA	NUMERO POOL	NUMERO CAMPIONI ANALIZZATI
Bergamo	9	9
Brescia	13	65
Cremona	30	52
Lecco	10	10
Lodi	3	3
Monza-Brianza	24	40
Milano	1	10
Pavia	2	2
<b>TOT</b>	<b>92</b>	<b>191</b>

**Tab.1:** Numero e provenienza dei pool e dei campioni di feci analizzati.

SPECIE	NUMERO CAMPIONI	SPECIE	NUMERO CAMPIONI
Airone cenerino	11	Germano reale	2
Airone guardabuoi	2	Gheppio	13
Allocco	3	Gufo comune	5
Assiolo	3	Ibis sacro	1
Astore	4	Merlo	1
Barbagianni	1	Nibbio	1
Beccaccia	1	Nitticora	1
Cigno	6	Picchio verde	2
Civetta	13	Piccione	2
Colombaccio	4	Pispola	1
Cornacchia grigia	2	Poiana	14
Falco lodolaio	1	Sparviere	8
Folaga	2	Tortora	2
Gabbiano comune	4	Upupa	1
Gabbiano reale	1	<b>TOT</b>	<b>115</b>

**Tab.2:** Numero dei campioni di visceri analizzati per le diverse specie aviarie.



**Graf.1:** Numero campioni di visceri analizzati provenienti dai CRAS della Valpre-

dina e di Vanzago.

#### *Indagini molecolari e filogenetiche*

I campioni sono stati omogenati in proporzione 1:10 con PBS addizionato dell'1% di penicillina e streptomicina, e del 10% di glicerina. Dopo centrifugazione a 3.750 rpm per 15 minuti, il surnatante è stato prelevato per effettuare l'estrazione dell'RNA tramite l'utilizzo di QIA Symphony come da istruzioni. L'RNA estratto è stato sottoposto a una PCR nested in grado di identificare tutti i generi di *Coronavirus*. È stato amplificato un frammento di 440 bp del gene codificante per l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) utilizzando primer e ciclo termico indicati da Chu et al (2011).

Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti a elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con sequenze presenti in GenBank, mediante allineamento con programma ClustalW. L'albero filogenetico maximum likelihood basato sul sequenziamento parziale del gene RdRp è stato eseguito utilizzando il software IQtree e il modello TN+F+G4 calcolato con Model Finder con un bootstrap di 1000 repliche.

#### **RISULTATI**

La PCR ha evidenziato la positività di 9 campioni fecali, dei quali però solo 6 sono stati confermati al sequenziamento riportando quindi una prevalenza del 3,1%. I campioni positivi provenivano dalle province di Cremona (n=3), Brescia (n=2) e Bergamo (n=1). Una sequenza relativa a un campione proveniente da Lecco è risultata invece mista. I campioni di visceri provenienti dai centri di recupero della fauna selvatica sono risultati tutti negativi.

Le analisi filogenetiche hanno confermato l'appartenenza delle sequenze isolate al gruppo *Gammacoronavirus* (vedi immagine 1).



**Immagine 1:** Albero filogenetico basato sulle sequenze parziali del gene RdRp

### DISCUSSIONE

I dati emersi in tale studio mettono in evidenza una bassa prevalenza di *Coronavirus*, rilevati peraltro solo nella popolazione di anatidi esaminata. Precedenti studi effettuati, sia in Europa che in altri continenti, evidenziano un'elevata eterogeneità nelle prevalenze rilevate, senza evidenziare particolari pattern di positività nelle specie studiate. Indagini condotte in Cina, Scandinavia e Australia, infatti, riportano valori di prevalenza intorno al 15-18% (Chu et al, 2011; Wille et al, 2016;

Chamings et al, 2018), discostandosi molto dai valori riportati invece in altri paesi asiatici o europei, dove le prevalenze si attestano al di sotto del 3% (Hughes et al, 2009; Kim et al, 2014; A Rohaim et al, 2019). Valori intermedi sono invece registrati per esempio in Madagascar e nella zona della Beringia, dove la prevalenza risulta inferiore del 10% nell'avifauna (Muradrasoli et al, 2010; de Sales Lima et al, 2015). Tali studi confermano una maggiore suscettibilità all'infezione da parte degli ordini *Anseriformes*, *Charadriiformes* e *Pelecaniformes*. Nel nostro studio sono risultati positivi esclusivamente campioni provenienti da anatidi avvalorando quanto già noto da bibliografia. Il fatto che le feci siano state raccolte da terra, non esclude completamente la possibilità che nel campione possano esserci tracce di feci provenienti anche da altre specie; sebbene le altre specie analizzate siano risultate negative evidenziando una probabile minore suscettibilità all'infezione. Ipotesi supportata dalla bassissima prevalenza riscontrata anche in altri studi in ordini diversi come, per esempio, *Passeriformes* e *Galliformes* (A Rohaim et al, 2019). Tuttavia la negatività di tutti i campioni di visceri potrebbe indicare una natura non idonea della matrice esaminata, sottostimando di fatto la prevalenza in tali specie. Successivamente a questa fase di screening sarebbe opportuno ampliare il numero dei soggetti testati, utilizzando la matrice fecale come ulteriore conferma di questo andamento.

Le analisi filogenetiche evidenziano l'appartenenza di tutte le sequenze isolate al gruppo di *Gammacoronavirus*. È possibile evidenziare una debole corrispondenza tra i ceppi isolati e le zone di provenienza: ceppi isolati nella medesima area di studio presentano maggiore vicinanza genetica rispetto ai ceppi provenienti da altre zone. Questo aspetto in particolare si può apprezzare per le due sequenze provenienti dal Parco Oglio Nord (Cremona) e le due provenienti dal lago d'Iseo (Brescia). Si potrebbe quindi ipotizzare che, per quanto si tratti di uccelli migratori, le sub-popolazioni campionate siano rappresentate da gruppi di animali pseudo-stanziali; in grado di avere un periodo di contatto con altri individui sufficiente per consentire la trasmissione virale.

Nonostante le sequenze analizzate rientrino nel gruppo *Gammacoronavirus*, è interessante osservare come siano posizionati in un sub-clade diverso da quello in cui sono riportati i ceppi di bronchite infettiva (IBV). Il riscontro di virus geneticamente correlati a ceppi vaccinali di IBV, all'interno di popolazioni di uccelli selvatici, ha portato alla luce l'ipotesi che questi potessero fungere sia da potenziale vettore asintomatico, che da serbatoio di tale infezione, soprattutto per gli allevamenti avicoli (Hughes et al, 2009). All'interno delle popolazioni selvatiche il virus potrebbe inoltre subire delle mutazioni in fase di replicazione in grado di far emergere nuove varianti, rendendo quindi parzialmente o totalmente inefficaci i vaccini in uso (Milek et al, 2018).

I dati emersi nel presente studio evidenziano sicuramente una bassa prevalenza di *Coronavirus* nelle popolazioni studiate, e al contempo l'assenza di genotipi riferibili a IBV. Tuttavia, anche in considerazione dei limiti evidenziati da tale studio nell'utilizzo di matrici biologiche probabilmente inadatte, sarebbe opportuno approntare un ulteriore campionamento per poter confermare con maggiore certezza i dati preliminari.

## BIBLIOGRAFIA

1. A Rohaim M, F El Naggar R, M Helal A, M Bayoumi M, A El-Saied M, A Ahmed K, Z Shabbir M and Munir M. (2019). Genetic diversity and phylodynamics of avian coronaviruses in Egyptian wild birds. *Viruses*. Jan;11(1):57.
2. Chamings A, Nelson TM, Vibin J, Wille M, Klaassen M and Alexandersen S. (2018) Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Scientific reports*. Apr 13;8(1):5980.
3. Chu DK, Leung CY, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tsemay MT, Guan Y, Peiris JS and Poon LL. (2011) Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of virology*. Dec 1;85(23):12815-20.
4. de Sales Lima FE, Gil P, Pedrono M, Minet C, Kwiatek O, Campos FS, Spilki FR, Roehe PM, Franco AC, Maminiaina OF and Albina E. (2015). Diverse gammacoronaviruses detected in wild birds from Madagascar. *European journal of wildlife research*. Aug 1;61(4):635-9.
5. Dong BQ, Liu W, Fan XH, Vijaykrishna D, Tang XC, Gao F, Li LF, Li GJ, Zhang JX, Yang LQ and Poon LL. (2007). Detection of a novel and highly divergent coronavirus from Asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China. *Journal of virology*. Jul 1;81(13):6920-6.
6. Hughes LA, Savage C, Naylor C, Bennett M, Chantrey J and Jones R. (2009). Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerging infectious diseases*. Jul;15(7):1091.
7. Kim HR and Oem JK. (2014). Surveillance of avian coronaviruses in wild bird populations of Korea. *Journal of wildlife diseases*. 2014 Oct;50(4):964-8.
8. McCluskey BJ, Haley C, Rovira A, Main R, Zhang Y and Barder S. (2016). Retrospective testing and case series study of porcine delta coronavirus in US swine herds. *Preventive veterinary medicine*. Jan 1;123:185-91.
9. Mihindukulasuriya KA, Wu G, Leger JS, Nordhausen RW and Wang D. (2008) Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *Journal of virology*. May 15;82(10):5084-8.
10. Miłek J and Blicharz-Domańska K. (2018). Coronaviruses in avian species—review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *Journal of veterinary research*. Sep 1;62(3):249-55.
11. Muradrasoli S, Bálint Á, Wahlgren J, Waldenström J, Belák S, Blomberg J and Olsen B. (2010) Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the Bering Strait area (Beringia). *PLoS One*. Oct 29;5(10):e13640.
12. Wille M, Muradrasoli S, Nilsson A and Järhult JD. (2016). High prevalence and putative lineage maintenance of avian coronaviruses in Scandinavian waterfowl. *PloS one*. Mar 3;11(3):e0150198.
13. Woo PC, Lau SK, Yip CC, Huang Y, Tsoi HW, Chan KH and Yuen KY. (2006). Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. *Journal of virology*. Jul 15;80(14):7136-45.