

DALL'EST ALL'OVEST: RICOSTRUZIONE FILODINAMICA DELLA STORIA DELLA VARIANTE 2 DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

Franzo G.¹, Legnardi M.¹, Grassi L.¹, Houta M. H.², Hassan K. E.², Tucciarone C.M.¹, Abdel-Moneim A.S.³, El-Sawah A.A.², Ali A.², Cecchinato M.¹

¹*Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italia;*

²*Poultry Diseases Department, Faculty of Veterinary Medicine, Beni-Suef University, Beni-Suef 62511, Egypt;*

³*Microbiology Department, Virology Division, College of Medicine, Taif University, Taif, Saudi Arabia.*

Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is one of the main infectious agents affecting the avian industry. The remarkable evolutionary rate of this virus represents an often-insurmountable challenge to its control, leading to the emergence of different lineages featured by different biological properties and limited cross-protection. In the present study, the origin, spreading and evolution of GI-23, one of the most important IBV emerging lineages, has been reconstructed using a phylodynamic approach. To this purpose, the broadest available collection of complete and partial S1 sequences was downloaded from GenBank and merged with specifically sequenced European strains. After a likely ancient origin, GI-23 circulated undetected in the Middle East for a considerable time, thereafter emerging as a threat in parallel with the intensification of the poultry industry and its introduction in other countries. An intensive viral circulation affecting mainly neighbouring countries or those with strong economic and political relationships was demonstrated, even though some nations appear to play a major role as a “bridge” among less related locations. Of note, a big recombinant cluster, likely originating in the Middle East but spreading thereafter, especially to Europe through Turkey, demonstrated a much-marked increase in viral population size, and potentially fitness, compared to previously circulating variants.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva (IBV) è attualmente classificato nella specie *Avian coronavirus*, genere *Gammacoronavirus*, famiglia *Coronaviridae* [1]. Presenta un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva di circa 27kb con la seguente organizzazione: 5'UTR-ORF1a/b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b-3'UTR. Il gene S, codificante per la proteina *Spike*, è largamente il più studiato. Tale proteina infatti gioca un ruolo fondamentale nella biologia del virus, mediandone l'adesione e la fusione alle cellule dell'ospite, oltre a rappresentare il principale target della risposta anticorpale neutralizzante. In aggiunta, in funzione della sua notevole variabilità genetica, si presta all'esecuzione di studi di epidemiologia molecolare nonché alla classificazione dei diversi ceppi [2,3]. A partire dalla sua prima identificazione negli anni 30, IBV è stato identificato a livello mondiale, rivelando una ragguardevole variabilità genetica e fenotipica, dovuta al rapido tasso di mutazione (10^{-3} - 10^{-5} sostituzioni/sito/anno) e ricombinazione che lo carat-

terizza [2,4,5]. Ciò ha portato all'emergere di diversi stipiti contraddistinti da differenti caratteristiche biologiche e spesso scarsa cross-protezione. Tra i criteri di classificazione introdotti nel tempo, quello attualmente più utilizzato si basa sull'analisi filogenetica e delle distanze genetiche della porzione S1 del gene S. Sulla base di questo schema sono attualmente riconosciuti 8 genotipi (da GI a GIII), a loro volta suddivisi in lineaggi [3]. Il lineaggio GI-23, anche noto come Variante2, è attualmente uno dei più diffusi e rilevanti. Inizialmente descritto in Medioriente circa 2 decenni fa, si è diffuso in diverse altre regioni inclusa dell'Africa, Asia ed Europa [6]. Nonostante la rilevanza di questa variante e le preoccupazioni che ha suscitato fra allevatori e veterinari, non sono ad oggi disponibili analisi formali volte a ricostruirne l'origine, l'evoluzione e i pattern di diffusione. Le analisi filodinamiche, combinando diversi approcci statistici, possono essere utilizzate per comprendere come la storia, l'evoluzione e l'epidemiologia di un virus ne plasmino, di fatto, il genoma e quindi la filogenesi. In questo modo, dallo studio delle sequenze virali è possibile ricostruire diversi parametri e aspetti che hanno caratterizzato la popolazione virale nel corso del tempo. In particolare, in questo studio è stata effettuata un'approfondita analisi mirata a studiare l'epidemiologia, i pattern di evoluzione e ricombinazione, le dinamiche di popolazione e le vie di diffusione del GI-23. Il ruolo della gestione degli animali, delle strategie di controllo e fattori socio-economici sono stati inoltre considerati per valutarne il potenziale impatto nella storia di questo virus.

MATERIALI E METODI

Sequenze europee

Lo studio ha preso in considerazione campioni inviati da diversi stati europei a fini diagnostici presso il laboratorio di malattie infettive veterinarie del dipartimento MAPS e costituiti in massima parte da pool di tamponi tracheali. La diagnosi di infezione e la caratterizzazione preliminare dei ceppi è stata effettuata tramite amplificazione e sequenziamento della terza regione ipervariabile (HVR3) del gene S1 utilizzando i primer XCE1 e XCE2 [7]. Una classificazione preliminare è stata effettuata confrontando le sequenze ottenute con il database di riferimento proposto da Valastro et al. [3]. Per tutti gli stipiti classificati come GI-23 si è cercato di sequenziare l'intera regione S1 utilizzando coppie di primer e un protocollo appositamente validato. Tutte le sequenze ottenute e i metadati ad esse associate sono state depositate in GenBank (Acc.Number MZ666004-MZ666086).

Dataset di sequenze internazionali

Tutte le sequenze del gene S1 di IBV, per le quali fosse disponibile il paese e la data di campionamento, sono state scaricate da Genbank e allineate alle sequenze di riferimento proposte da Valastro et al. [3] utilizzando MAFFT [8]. Un albero filogenetico è stato ricostruito utilizzando IQ-Tree [9] e le sequenze clusterizzate con le referenze del genotipo GI-23 sono state selezionate e incluse nelle successive analisi. Inoltre, al fine di aumentare il numero e la rappresentatività delle sequenze utilizzate, sono stati creati dei dataset accessori che includevano tutte le sequenze disponibili delle regioni ipervariabili HVR1/2 e HVR3, classificate nel lineaggio GI-23 utilizzando l'approccio precedentemente descritto. Le sequenze ottenute a livello europeo, assieme a quelle di vaccini basati sul GI-23 attualmente disponibili, sono state integrate in questo dataset. Un'ulteriore analisi filogenetica è stata eseguita per identificare ed escludere tutte le sequenze che presentavano un chiaro clustering con quelle vaccinali.

Analisi di ricombinazione

I dataset ottenuti sono stati testati per valutare la presenza di fenomeni di ricombinazione utilizzando il software RDP4 [10], ottimizzando i parametri di analisi sulla base delle caratteristiche del dataset in esame. Sono stati accettati solo gli eventi di ricombinazione rilevati da almeno 3 dei metodi statistici implementati nel software aventi una significatività pari a $p\text{-value} < 10^{-5}$. Infine, la presenza di residue evidenze di ricombinazione e la localizzazione dei breakpoint è stata confermata usando GARD [11].

Analisi filodinamica

I dataset, in assenza di residue evidenze di ricombinazione, sono stati analizzati mediante l'approccio Bayesiano alla coalescente seriale implementato in BEAST [12] al fine di stimare diversi parametri di popolazione quali il time to most recent common ancestor (tMRCA), il tasso evolutivo e le dinamiche della popolazione virale. Un'analisi filogeografica è stata effettuata considerando la nazione di campionamento di ciascun ceppo come tratto discreto, al fine di ricostruire la migrazione virale nel corso del tempo, come descritto da Lemey et al., (2009) [13]. Per ogni dataset sono state condotte 3 simulazioni di 200 milioni di generazioni che sono poi state unite in un unico file utilizzando logcombiner. La qualità e robustezza dei risultati ottenuti sono state analizzate e riassunte con Tracer 1.6. Le stime ottenute sono state riassunte in termini di media e 95% High Posterior Probability (95HPD). Similmente, è stato ottenuto un Maximum clade credibility tree (MCC), sulla base di tutti gli alberi generati nel corso delle simulazioni. Il software SpreadD3 è stato utilizzato per graficare il processo di diffusione virale nello spazio e nel tempo e per valutare le connessioni fra stati caratterizzate da un adeguato supporto statistico (i.e. Bayesian Factor >10). Ulteriori statistiche riassuntive e grafici sono stati generati in R.

RISULTATI

Analisi di ricombinazione e dataset di lavoro

Un totale di 231 sequenze complete del gene S1, 270 dell'HVR1/2 e 341 dell'HVR3, rappresentative rispettivamente di 8, 12 e 14 stati, sono state incluse nello studio.

Il dataset comprendente le sequenze complete di S1 ha dimostrato significative evidenze di ricombinazione, e un breakpoint in posizione 780 dell'allineamento è stato identificato sia con RDP che con GARD. Evidenze di ricombinazione non sono state invece riscontrate per le regioni HVR1/2 e HVR3.

Conseguentemente, per poter eseguire le successive analisi, l'allineamento basato sul gene S1 è stato suddiviso in 2 nuovi allineamenti sulla base di questo breakpoint che sono poi stati analizzati in modo indipendente. Tali analisi hanno permesso inoltre di evidenziare un numeroso gruppo di ceppi ricombinanti che includeva principalmente, sebbene non esclusivamente, stipiti Europei. Entrambi i ceppi parentali facevano parte di cluster che includevano essenzialmente sequenze di origine egiziana. Considerata la potenziale rilevanza epidemiologica ed evolutiva di questo evento di ricombinazione, è stato creato un dataset dedicato che includesse tutti questi ceppi ricombinanti.

In definitiva, sono stati analizzati i seguenti database di sequenze:

- a) Regione N-terminale del gene S1
- b) Regione C-terminale del gene S1
- c) Cluster ricombinante
- d) HVR1/2
- e) HVR3

Analisi filodinamica

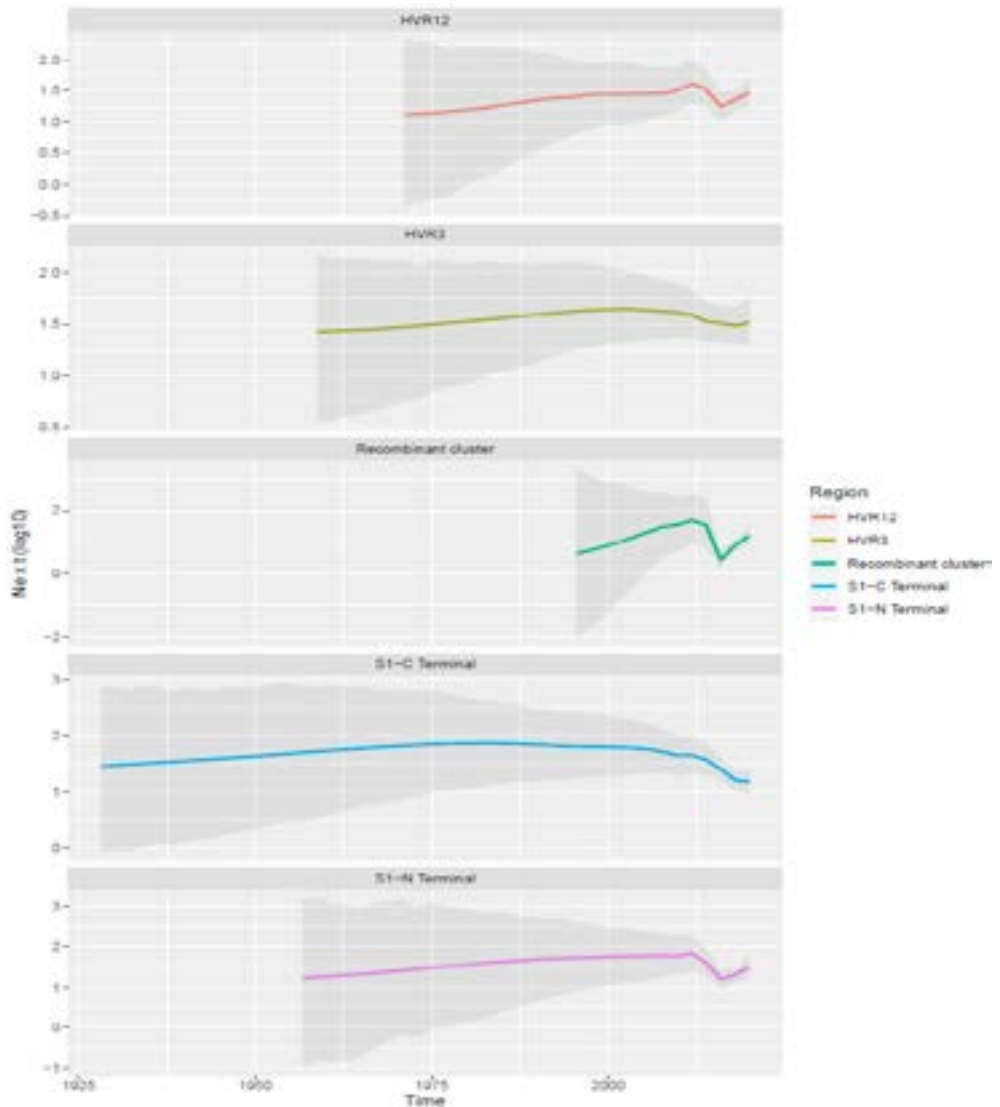
La stima dei principali parametri di popolazione ottenuta dall'analisi dei diversi dataset è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Riassunto delle principali caratteristiche dei dataset analizzati e delle stime dei parametri di popolazione.

Data-base	Regione	Numero di sequenze	Anni	Numero di stati	tMRCA (Anni)			Origine			Tasso evolutivo		
					Media	Lower 95HPD	Higher 95HPD	Media	Lower 95HPD	Higher 95HPD	Media	Lower 95HPD	Higher 95HPD
A	SI-N terminale	231	1998-2020	8	58,737	43,828	81,972	1961,263	1938,028	1976,172	3,05·10 ⁻³	2,54·10 ⁻³	3,69·10 ⁻³
B	SI-C terminale	231	1998-2020	8	86,13	64,25	120,229	1933,87	1899,771	1955,75	1,48·10 ⁻³	1,23·10 ⁻³	1,78·10 ⁻³
C	Cluster ricombinante	188	2006-2020	6	23,618	19,008	31,081	1996,382	1988,919	2000,992	1,77·10 ⁻³	2,13·10 ⁻³	2,60·10 ⁻³
D	HVR1/2	270	1996-2020	12	57,942	45,787	75,2	1962,058	1944,8	1974,213	6,02·10 ⁻³	4,96·10 ⁻³	7,33·10 ⁻³
E	HVR3	341	1998-2020	14	46,622	37,628	61,372	1973,378	1958,628	1982,372	1,90·10 ⁻³	2,30·10 ⁻³	2,81·10 ⁻³

La valutazione delle dinamiche di popolazione nel corso del tempo ha rivelato dei pattern sostanzialmente concordanti fra i dataset A e D, e B ed E (Figura 1).

Figura 1. Ricostruzione delle dinamiche della popolazione virale nel tempo. Il valore medio è rappresentato da una linea continua (colorata in funzione del dataset in esame) mentre gli intervalli 95HPD sono rappresentati dalle aree ombreggiate.

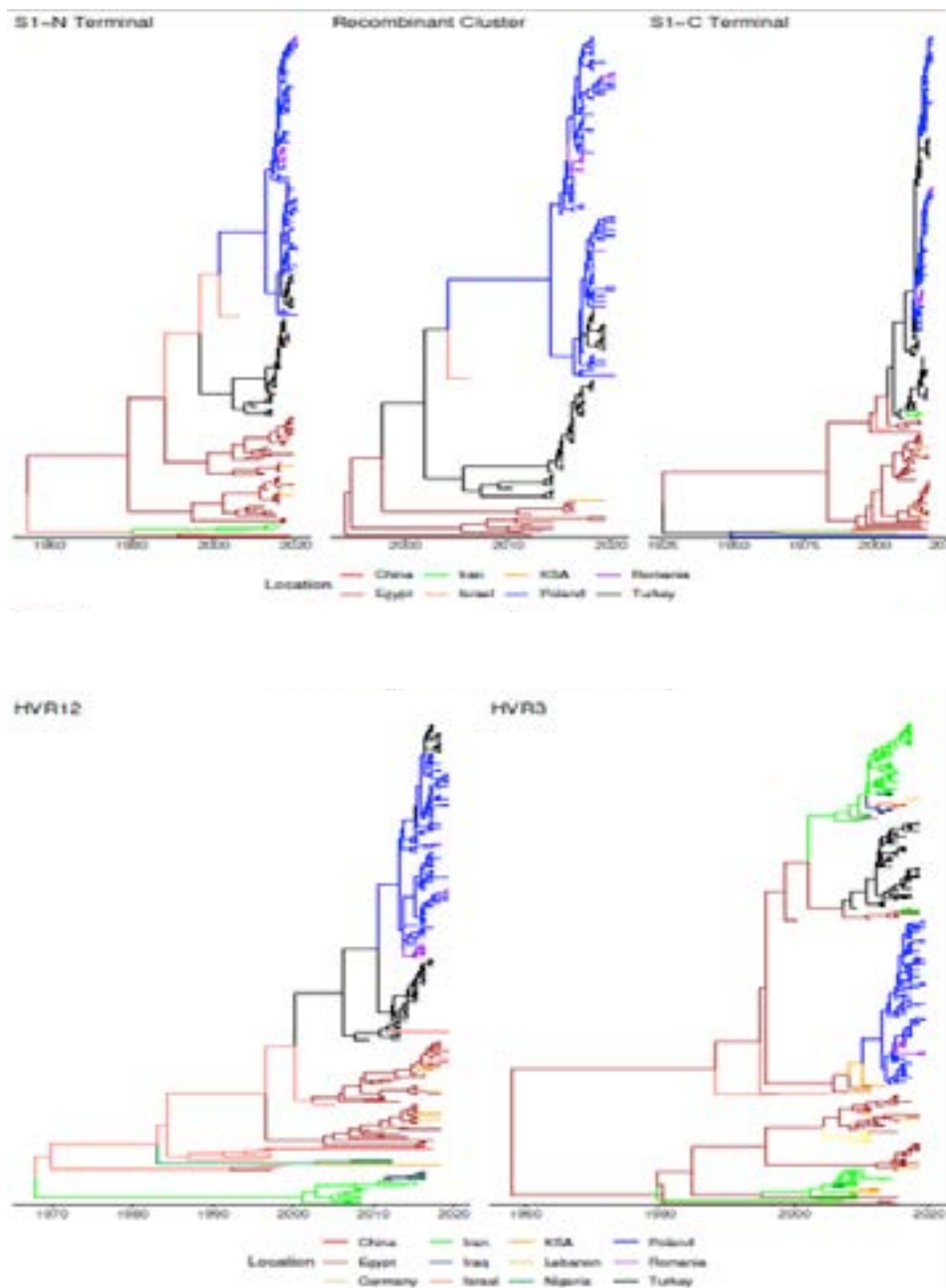


Complessivamente, una circolazione virale scarsa ma in lento e progressivo aumento è stata osservata sino indicativamente al periodo 2006-2010. Successivamente, una diminuzione nella stima delle dimensioni della popolazione virale ha caratterizzato i database basati sulla regione C-terminale dell'S1 e l'HVR3 mentre un secondo incremento, evidenziato a partire dal 2015 è stato osservato nel caso dei database N-terminale e HVR1/2. Uno scenario parzialmente sovrapponibile ha caratterizzato il cluster ricombinante che, dopo la sua origine indicativamente nella metà degli anni '90, ha dimostrato una rapida espansione, cui è seguito un marcato declino e ripresa nel periodo fra il 2010 e il 2020.

L'analisi filogeografica sembra suggerire che questo lineaggio possa aver avuto origine negli anni '50 in Medioriente, con maggior probabilità nell'area attualmente corrispondente a Israele/Palestina o, in subordine, in Egitto.

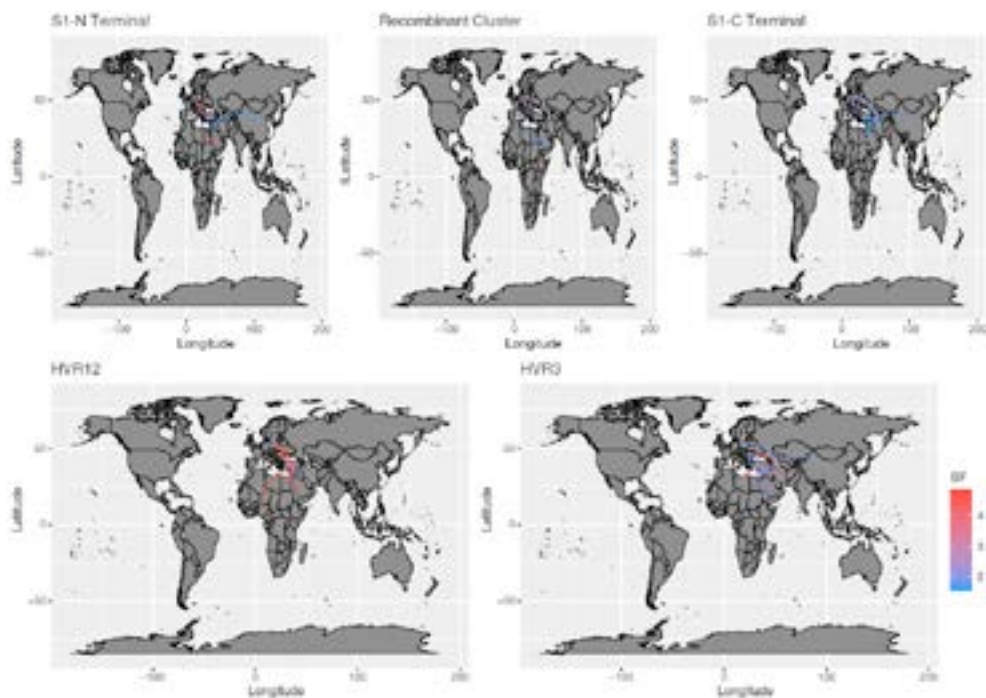
Successivamente, si sarebbe diffuso ad altri stati del Medioriente, inclusi gli Emirati Arabi Uniti e la Turchia. Quest'ultima poi avrebbe "mediato" la trasmissione dell'infezione verso l'Europa. Israele è stato anche identificato come potenziale fonte di introduzione della variante in Cina. È interessante notare come il cluster ricombinante abbia seguito una traiettoria più "europea", a differenza di altri ceppi che hanno circolato indipendentemente in Medioriente: dopo una probabile origine in Egitto, questo ceppo si sarebbe diffuso in Turchia indicativamente negli anni 2000 e quindi in Europa (~ 2010-2015), venendo introdotto con ogni probabilità in Polonia. La successiva introduzione in Romania è avvenuta probabilmente a più riprese nel corso del tempo (Figura 2).

Figura 2. MCC ricostruiti sulla base dei diversi dataset (i.e. regioni del gene S1 e cluster ricombinante). I rami degli alberi filogenetici sono stati colorati sulla base del paese in cui, con maggior probabilità, circolavano gli antenati degli stipiti campionati.



L'analisi di tutte le sequenze per le quali fosse disponibile almeno la regione HVR1/2 o HVR3 ha confermato il pattern sopra descritto, fornendo in aggiunta una maggiore risoluzione spaziale dato il maggior numero di paesi per i quali fossero fruibili delle sequenze. Un'origine mediorientale (Egitto e Israele) è stata inferita con entrambe le regioni. L'Iran, dopo l'importazione del GI-23 dall'Egitto, sembra aver svolto un ruolo rilevante nella successiva diffusione nella regione, ed in particolare in Kurdistan e Iraq, da dove Variante2 si sarebbe poi diffusa in Afghanistan e Siria. Parallelamente, l'Egitto sarebbe coinvolto nella diffusione virale in Libia e Oman, mentre i ceppi identificati in Libano e Nigeria avrebbero una probabile origine Israeliana. Valutando le connessioni internazionali caratterizzate da un elevato supporto statistico, lo scenario precedentemente descritto appare sostanzialmente confermato, con vie di diffusione consistenti specialmente all'interno dell'Europa, del Medio e Estremo Oriente, a loro volta connessi da un numero limitato di stati "ponte"; Turchia e Iran in particolare (Figura 3).

Figura 3. Rappresentazione grafica pattern di migrazione virale fra paesi aventi elevato supporto statistico ($BF > 10$) calcolato per i diversi dataset.



DISCUSSIONE

Il grande potenziale evolutivo di IBV ha portato all'emergere di diversi genotipi e lineaggi nel corso del tempo, alcuni dei quali caratterizzati da un notevole successo epidemiologico [14]. Fra questi spicca sicuramente il GI-23, inizialmente identificato in Medioriente ma attualmente circolante in Asia, Africa ed Europa. Sfortunatamente, sia in ambito diagnostico che di ricerca, la mancata standardizzazione dei protocolli di sequenziamento e la notevole variabilità dei tratti genomici interessati rende spesso difficile, se non impossibile, il confronto dei dati disponibili. Inoltre, differenze nella regione genomica considerata e nella composizione del database di sequenze possono portare alla ricostruzione di storie evolutive diverse. Per questo motivo si è scelto di creare più dataset ed analizzarli indipendentemente, massimizzando l'informazione disponibile.

Indipendentemente dal dataset preso in considerazione, il presente studio conferma alcune evidenze già dimostrate per altri lineaggi di IBV (e.g. GI-16 e GI-19), ossia l'elevato tasso evolutivo e la tendenza a circolare, anche per prolungati periodi di tempo, prima dell'identificazione formale [4,15]. Il GI-23 ha rivelato un tasso evolutivo comparabile a quello di altre varianti rivelatesi una grande minaccia per l'allevamento avicolo nel lungo periodo. È quindi possibile ipotizzare un simile potenziale anche per questo lineaggio.

L'analisi delle dinamiche di popolazione e la filogeografia del GI-23 ha permesso una maggiore comprensione della sua epidemiologia ed evoluzione, il cui successo ha probabilmente richiesto l'intervento di diversi co-fattori.

Infatti, questo gruppo virale ha circolato per un lungo periodo, senza essere identificato, in Medioriente, a bassa prevalenza e probabilmente causando danni modesti [16–22]. Tale scenario potrebbe essere ricondotto a diverse concause, non mutualmente esclusive: 1) una virulenza inizialmente modesta, a cui avrebbe fatto seguito una progressiva evoluzione con conseguente aumento in infettività, virulenza ecc.; 2) uno sviluppo limitato dell'avicoltura in queste regioni nella seconda metà del secolo scorso; 3) una scarsa attività diagnostica legata alle scarse risorse economiche e tecnologiche.

Successivamente, fra gli anni '90 e 2000, è stato evidenziato un aumento progressivo ma costante della dimensione della popolazione virale, probabile conseguenza della diffusione ad altri stati della regione e della comparsa (o aumento) di "fattori di rischio". È interessante in tal senso come molte delle sequenze ottenute in questo periodo originino da stati quali Israele e Turchia. Il sistema di allevamento più avanzato ed intensivo in questi paesi rispetto a quelli limitrofi potrebbe aver creato condizioni favorevoli per un'espansione della popolazione virale, mentre servizi veterinari e diagnostici più avanzati avrebbero permesso una più efficace identificazione del problema. In altre parole, lo sviluppo più tardivo del settore avicolo in Medioriente potrebbe aver contribuito a ritardare l'espansione di questo lineaggio rispetto ad altri, quali QX (GI-19) e Q1 (GI-16) che hanno infatti circolato più precocemente nei paesi industrializzati [4,15].

La successiva fase di diminuzione e ripresa nelle dimensioni della popolazione virale è di più difficile interpretazione. In quel periodo un vaccino omologo è stato sviluppato e applicato in alcuni stati [23–26]. Sebbene la percentuale di popolazione avicola effettivamente coinvolta dalla vaccinazione a livello mondiale sia trascurabile, va ricordato che la stragrande maggioranza delle sequenze disponibili

nel corrispondente periodo originano proprio da quegli stati più industrializzati dove la vaccinazione veniva applicata. Di conseguenza, la diminuzione nella dimensione della popolazione virale potrebbe riflettere dei pattern locali in stati dove veniva applicata la vaccinazione, piuttosto che uno scenario globale dove l'impatto della vaccinazione potrebbe dirsi trascurabile. Altre ipotesi e fattori epidemiologici potrebbero giustificare lo scenario osservato e sarebbero sicuramente degni di studi approfonditi se dovessero rendersi disponibili nuove sequenze.

Dall'analisi filogeografica emerge inoltre come la circolazione virale, in particolare a livello Europeo, appaia ridotta rispetto ad altre varianti precedentemente menzionate. Anche in Medio Oriente ed Asia, l'espansione virale sembra coinvolgere primariamente paesi confinanti o con forti relazioni di carattere economico e politico. Appare quindi legittimo ipotizzare come frequenti e stretti contatti fra paesi si siano resi necessari per l'importazione di questa variante. Solo alcune nazioni, Turchia in particolare, hanno svolto un ruolo prioritario nella diffusione del virus fra paesi appartenenti a diverse macroaree geografiche.

In tale frangente non può però essere sminuito l'impatto negativo della scarsa attività di sequenziamento che ha caratterizzato i primi anni della circolazione virale, in particolar modo nei paesi in via di sviluppo. Questa mancanza di dati limita sicuramente lo studio della migrazione virale e diversi "passaggi" fra uno stato e l'altro potrebbero non essere stati identificati, così come la direzionalità della trasmissione potrebbe essere stata mal interpretata. Infatti, nonostante gli sforzi spesi per costituire dei dataset quanto più completi possibile, la maggior parte dei ceppi di GI-23 non è sicuramente stata identificata e sequenziata. La natura retrospettiva dello studio ha poi reso di fatto impossibile l'acquisizione di nuovi dati. Tali evidenze dovrebbero fungere da monito sull'importanza di un'attività di sequenziamento quanto più intensa e standardizzata possibile, e dall'imprescindibile sforzo di condivisione dei dati disponibili a livello internazionale. Nonostante questi innegabili limiti, che impongono prudenza nell'interpretazione dei risultati, la concordanza dei risultati ottenuti analizzando diversi dataset supporta la robustezza dei dati ottenuti.

Una nota a parte, data la grande rilevanza sotto il profilo evolutivo, è rappresentata dal grande successo dimostrato del cluster ricombinante. Infatti, questa clade ha rivelato una maggiore capacità espansiva anche durante la sua circolazione nella regione Medio Orientale, a supporto di un incremento della sua fitness. Il successivo declino che caratterizza anche questa clade, similmente alle altre, potrebbe essere ascrivibile all'applicazione di misure di controllo in combinazione con la crescente immunità di popolazione. Questa ipotesi spiegherebbe anche la seconda impennata nelle dimensioni di questo cluster che segue la sua introduzione in Europa, in presenza di una popolazione naïve ed in assenza di vaccini specifici per questa variante [27,28]. Sebbene studi sperimentali abbiano evidenziato l'effetto proteggente dei vaccini attualmente utilizzati in Europa nei confronti del GI-23, evidenze consistenti che questo avvenga anche in condizioni di campo non sono ad oggi presenti, e dovrebbero quindi essere attentamente valutate [25,28].

CONCLUSIONI

Complessivamente, lo studio della storia del lineaggio GI-23 può essere considerato una chiara rappresentazione della rilevanza pratica della "triade epidemiolo-

gica”. L’interazione fra l’evoluzione virale (e.g. il potenziale aumento di virulenza del cluster ricombinante), l’ospite (popolazioni animali più dense, stressate e con un patrimonio genetico più omogeneo) e ambiente (condizioni di allevamento e gestione degli stessi, presenza di co-infezioni, applicazione di strategie di controllo) appare infatti implicata nel determinismo dell’epidemiologia di questo lineage. Scenari del tutto comparabili, in parte condizionati da fattori deterministici, in parte stocastici, potrebbero spiegare il successo differenziale di altre varianti di IBV comparse a livello mondiale nel corso del tempo. Lo studio delle diverse varianti virali potrebbe quindi permettere di svelare connessioni epidemiologiche precedentemente sconosciute assieme ai sottostanti fattori determinanti. Conseguentemente, ulteriori e più approfonditi studi dovrebbero essere incoraggiati e sostenuti per incrementare la conoscenza globale di questo argomento, fornendo informazioni e competenze che potrebbero essere facilmente estese ad altre infezioni di interesse veterinario e umano. In tal senso, l’approccio ivi descritto potrebbe trovare immediata applicazione allo studio di altri lineaggi di IBV attualmente poco noti e/o circolati in aree geografiche trascurate per la loro scarsa rilevanza economica. Infine, i limiti dello studio legati alla scarsità di sequenze, al *bias* nella loro distribuzione geografica e temporale e alla mancata standardizzazione dell’approccio di sequenziamento dovrebbero fungere da monito sulla rilevanza di implementare attività di sequenziamento routinarie, rappresentative dello scenario epidemiologico e concertate fra laboratori di diverse regioni del mondo.

BIBLIOGRAFIA

1. Jackwood, M.W.; Wit, S. Infectious Bronchitis. In *Diseases of Poultry*; Wiley, 2020; Vol. 12, pp. 167–188.
2. Jackwood, M.W.; Hall, D.; Handel, A. Molecular Evolution and Emergence of Avian Gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2012, *12*, 1305–1311, doi:10.1016/j.meegid.2012.05.003.
3. Valastro, V.; Holmes, E.C.; Britton, P.; Fusaro, A.; Jackwood, M.W.; Cattoli, G.; Monne, I. S1 Gene-Based Phylogeny of Infectious Bronchitis Virus: An Attempt to Harmonize Virus Classification. *Infection, Genetics and Evolution* 2016, *39*, 349–364, doi:10.1016/j.meegid.2016.02.015.
4. Franzo, G.; Massi, P.; Tucciarone, C.M.; Barbieri, I.; Tosi, G.; Fiorentini, L.; Ciccozzi, M.; Lavazza, A.; Cecchinato, M.; Moreno, A. 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* 2017, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0184401.
5. Moreno, A.; Franzo, G.; Massi, P.; Tosi, G.; Blanco, A.; Antilles, N.; Biarnes, M.; Majó, N.; Nofrarias, M.; Dolz, R.; et al. A Novel Variant of the Infectious Bronchitis Virus Resulting from Recombination Events in Italy and Spain. *Avian Pathology* 2017, *46*, 28–35, doi:10.1080/03079457.2016.1200011.
6. Houta, M.H.; Hassan, K.E.; El-Sawah, A.A.; Elkady, M.F.; Kilany, W.H.; Ali, A.; Abdel-Moneim, A.S. The Emergence, Evolution and Spread of Infectious Bronchitis Virus Genotype GI-23. *Archives of Virology* 2021, *166*, 9–26.
7. Cavanagh, D.; Mawditt, K.; Britton, P.; Naylor, C.J. Longitudinal Field Studies of Infectious Bronchitis Virus and Avian Pneumovirus in Broilers Using

- Type-Specific Polymerase Chain Reactions. *Avian Pathology* 1999, 28, 593–605, doi:10.1080/03079459994399.
8. Standley, K. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.(Outlines Version 7). *Molecular Biology and Evolution* 2013, 30, 772–780, doi:10.1093/molbev/mst010 [doi].
 9. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 2015, 32, 268–274, doi:10.1093/molbev/msu300.
 10. Martin, D.P.; Murrell, B.; Golden, M.; Khoosal, A.; Muhire, B. RDP4: Detection and Analysis of Recombination Patterns in Virus Genomes. *Virus Evolution* 2015, 1, 1–5, doi:10.1093/ve/vev003.
 11. Kosakovsky Pond, S.L.; Posada, D.; Gravenor, M.B.; Woelk, C.H.; Frost, S.D.W. GARD: A Genetic Algorithm for Recombination Detection. *Bioinformatics* 2006, 22, 3096–3098, doi:10.1093/bioinformatics/btl474.
 12. Suchard, M.A.; Lemey, P.; Baele, G.; Ayres, D.L.; Drummond, A.J.; Rambaut, A. Bayesian Phylogenetic and Phylodynamic Data Integration Using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 2018, 4, doi:10.1093/ve/vey016.
 13. Lemey, P.; Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Suchard, M.A. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PLoS Computational Biology* 2009, 5, e1000520, doi:10.1371/journal.pcbi.1000520.
 14. Cook, J.K.A.; Jackwood, M.; Jones, R.C. The Long View: 40 Years of Infectious Bronchitis Research. *Avian Pathology* 2012, 41, 239–250, doi:10.1080/03079457.2012.680432.
 15. Franzo G.; Cecchinato M.; Tosi G.; Fiorentini L.; Faccin F.; Tucciarone C.M.; Trogu T.; Barbieri I.; Massi P.; Moreno A. GI-16 Lineage (624/I or Q1), There and Back Again: The History of One of the Major Threats for Poultry Farming of Our Era. *PLOS ONE* 2018, 13, e0203513, doi:10.1371/journal.pone.0203513.
 16. Abdel-Moneim, A.S.; Madbouly, H.M.; Gelb, J.; Ladman, B.S. Isolation and Identification of Egypt/Beni-Seuf/01 a Novel Genotype of Infectious Bronchitis Virus. *VETERINARY MEDICAL JOURNAL-GIZA-* 2002, 50, 1065–1078.
 17. Al-Mubarak, A.I.A.; Al-Kubati, A.A.G. Cocirculation of Four Infectious Bronchitis Virus Lineages in Broiler Chickens in the Eastern Region of Saudi Arabia from 2012 to 2014. *Veterinary Medicine International* 2020, 2020, doi:10.1155/2020/6037893.
 18. Gelb, J.; Weisman, Y.; Ladman, B.S.; Meir, R. S1 Gene Characteristics and Efficacy of Vaccination against Infectious Bronchitis Virus Field Isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathology* 2005, 34, 194–203, doi:10.1080/03079450500096539.
 19. Hosseini, H.; Fard, M.H.B.; Charkhkar, S.; Morshed, R. Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010–2014). *Avian Diseases* 2015, 59, 431–435, doi:10.1637/11091-041515-ResNote.1.
 20. Meir, R.; Rosenblut, E.; Perl, S.; Kass, N.; Ayali, G.; Hemsani, E.; Perk, S. Identification of a Novel Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus in Israel. *Avian Diseases* 2004, 48, 635–641, doi:10.1637/7107.
 21. Moharam, I.; Sultan, H.; Hassan, K.; Ibrahim, M.; Shany, S.; Shehata, A.A.;

- Abo-ElKhair, M.; Pfaff, F.; Höper, D.; el Kady, M.; et al. Emerging Infectious Bronchitis Virus (IBV) in Egypt: Evidence for an Evolutionary Advantage of a New S1 Variant with a Unique Gene 3ab Constellation. *Infection, Genetics and Evolution* 2020, 85, doi:10.1016/j.meegid.2020.104433.
22. Zany, A.; Naguib, M.M.; El-Husseiny, M.H.; Mady, W.; Hagag, N.; Arafa, A.S. The Sequence of the Full Spike S1 Glycoprotein of Infectious Bronchitis Virus Circulating in Egypt Reveals Evidence of Intra-Genotypic Recombination. *Archives of Virology* 2016, 161, 3583–3587, doi:10.1007/s00705-016-3042-1.
 23. Abozeid, H.H.; Paldurai, A.; Varghese, B.P.; Khattar, S.K.; Afifi, M.A.; Zouel-fakkar, S.; El-Deeb, A.H.; El-Kady, M.F.; Samal, S.K. Development of a Recombinant Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccine for Infectious Bronchitis Virus Variant Strains Circulating in Egypt. *Veterinary Research* 2019, 50, doi:10.1186/s13567-019-0631-5.
 24. Al-Ebshahy, E.; Abdel-Sabour, M.; Abas, O.; Yanai, T. Protection Conferred by a Vaccine Derived from an Inactivated Egyptian Variant of Infectious Bronchitis Virus: A Challenge Experiment. *Tropical Animal Health and Production* 2019, 51, 1997–2001, doi:10.1007/s11250-019-01898-y.
 25. Ali, A.; Kilany, W.H.; Zain El-Abideen, M.A.; el Sayed, M.; Elkady, M. Safety and Efficacy of Attenuated Classic and Variant 2 Infectious Bronchitis Virus Candidate Vaccines. *Poultry Science* 2018, 97, 4238–4244, doi:10.3382/ps/pey312.
 26. Sultan, H.A.; Ali, A.; el Feil, W.K.; Bazid, A.H.I.; Zain El-Abideen, M.A.; Kilany, W.H. Protective Efficacy of Different Live Attenuated Infectious Bronchitis Virus Vaccination Regimes Against Challenge With IBV Variant-2 Circulating in the Middle East. *Frontiers in Veterinary Science* 2019, 6, 341, doi:10.3389/fvets.2019.00341.
 27. Lisowska, A.; Sajewicz-Krukowska, J.; Fusaro, A.; Pikula, A.; Domanska-Blicharz, K. First Characterization of a Middle-East GI-23 Lineage (Var2-like) of Infectious Bronchitis Virus in Europe. *Virus Research* 2017, 242, 43–48, doi:10.1016/j.virusres.2017.09.010.
 28. Lisowska, A.; Piłula, A.; Opolska, J.; Jasik, A.; Kycko, A.; Domańska-Blicharz, K. Virulence Properties of GI-23 Infectious Bronchitis Virus Isolated in Poland and Efficacy of Different Vaccination Strategies. *Pathogens* 2021, 10, 522, doi:10.3390/pathogens10050522.