

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

**Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
Medicina Veterinaria**

**Dinamiche di popolazione del virus della bronchite  
infettiva aviaria (IBV)  
genotipo QX (GI-19) in Italia**

Relatore  
Prof. Mattia Cecchinato

Correlatori  
Dott. Giovanni Franzo  
Dott. Matteo Legnardi

Laureanda  
Stefania Leone  
Matricola n. 1083965

ANNO ACCADEMICO 2018/2019



# 1 RIASSUNTO

---

La bronchite infettiva aviaria (IB) è una patologia virale dal forte impatto economico e sanitario su ogni comparto dell'avicoltura mondiale. Essa è causata dal virus della bronchite infettiva (IBV), un coronavirus diffuso a tutte le latitudini e il cui controllo prevede l'adozione routinaria della vaccinazione.

Esistono moltissime varianti genotipiche di IBV, alcune endemiche, altre ubiquitarie, che possono differire per virulenza e tropismo.

Per prevalenza e rilevanza clinica, il *lineage* più importante in Italia e in Europa è ad oggi il GI-19 (più comunemente conosciuto come QX).

Nel presente lavoro si è svolta un'indagine retrospettiva su larga scala per valutare, in condizioni di campo, il potenziale impatto della vaccinazione sulle dinamiche di popolazione di QX.

Prendendo in considerazione una delle maggiori filiere italiane, sono stati comparati, attraverso analisi biostatistiche, il periodo precedente e quello successivo all'introduzione di una vaccinazione omologa, cioè con vaccino vivo attenuato contenente un ceppo QX, per determinare se questo evento potesse aver condizionato l'evoluzione di questo genotipo nell'area di studio.

I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di una maggior pressione evolutiva in seguito al cambio di strategia vaccinale, fornendo utili informazioni su un effetto dell'adozione estensiva di vaccini vivi spesso poco considerato, ma con notevoli ripercussioni sul lungo periodo.



## 2 ABSTRACT

---

Avian infectious bronchitis (IB) is a viral disease with a severe economic and health impact on every sector of the poultry industry. It is caused by infectious bronchitis virus (IBV), a worldwide spread coronavirus whose control relies on routine vaccination.

There are many genotypic variants of IBV, some endemic to certain countries, others ubiquitous, which may differ in virulence and tropism.

For prevalence and clinical relevance, nowadays the most important lineage in Italy and in Europe is GI-19 (commonly known as QX).

In this work, a large-scale retrospective survey was carried out to assess, under field conditions, the potential impact of vaccination on QX population dynamics.

Considering one of the major Italian integrated poultry companies, the period before and the one following the introduction of a homologous QX-based vaccination were compared through biostatistical analyses to determine whether this event could have affected the evolution of QX.

The results obtained showed the presence of a greater evolutionary pressure following the change of vaccination strategy, providing information on an effect of the extensive adoption of live vaccines which, despite being little considered, may have considerable long term repercussions.



### 3 INDICE

---

1	RIASSUNTO.....	3
2	ABSTRACT .....	5
4	Introduzione.....	9
4.1	Eziologia.....	10
4.2	Patogenesi .....	11
4.3	Segni clinici e lesioni .....	12
4.4	Diagnosi .....	15
4.5	Distribuzione.....	19
4.6	Strategie di controllo.....	20
4.7	Il <i>lineage</i> QX (GI-19) .....	21
5	Materiali e metodi .....	25
5.1	Selezione dei campioni .....	25
5.2	Estrazione dell'RNA Virale .....	25
5.3	Disegno dei primer .....	25
5.4	Protocollo di RT-PCR.....	26
5.5	Elettroforesi su gel e lettura dei risultati .....	27
5.6	Sequenziamento .....	27
5.7	Allineamento e genotipizzazione.....	28
5.8	Analisi della pressione selettiva pervasiva ed episodica.....	28
5.9	<i>Homology modeling</i> della subunità S1 .....	28
6	Risultati e discussione.....	29
6.1	Campioni e sequenziamento.....	29
6.2	Analisi della pressione selettiva pervasiva ed episodica.....	29
6.3	<i>Homology modeling</i> .....	33
7	Conclusioni .....	37
8	Bibliografia.....	39
9	Sitografia .....	47



## 4 INTRODUZIONE

---

L'industria avicola rappresenta il secondo settore per produzione di carni a livello mondiale (<http://www.fao.org/faostat>). In Italia, il valore dell'avicoltura sfiora gli 8 miliardi di euro, con una filiera che conta 2.600 allevamenti di polli registrati in Anagrafe Nazionale in cui sono allevati oltre 71 milioni di capi all'anno. Le carni avicole sono le più consumate nel nostro Paese e rappresentano circa il 38% dei consumi domestici di carni (report ISMEA 2019).

Nonostante gli elevati standard di biosicurezza adottati negli allevamenti intensivi, le malattie infettive continuano a rappresentare una minaccia per la produttività del settore e la salute degli animali allevati.

Tra le problematiche ad eziologia virale, la bronchite infettiva (BI) rappresenta una delle maggiori minacce, con danni economici secondi solo a quelli causati dall'influenza aviaria (<https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/27118>).

Essa colpisce animali di ogni età e tipo produttivo ed è sostenuta dal virus della bronchite infettiva (IBV), diffuso in tutto il globo.

La complessa epidemiologia di questo patogeno, in continua e rapida evoluzione e di cui esistono moltissime varianti genetiche, ne rende estremamente difficile il controllo. Per questo motivo, gli sforzi tesi a una miglior comprensione dell'epidemiologia molecolare di IBV e del potenziale impatto che su di esso hanno i vaccini vivi attenuati nel loro utilizzo estensivo, possono avere significative ricadute pratiche sulla lotta a questa patologia.

In questo studio, ci si è focalizzati sul *lineage* predominante nel nostro paese nonché in Europa, ossia GI-19 (altresì conosciuto come QX) (Valastro et al., 2016). Tramite analisi biostatistiche, è stato valutato l'impatto sull'evoluzione di QX della recente introduzione, in una delle principali filiere italiane, di una vaccinazione omologa. I dati ottenuti, oltre a supportare una pianificazione più consapevole dei protocolli vaccinali da adottare per controllare QX così come altri *lineage*, permettono inoltre di trarre indicazioni più generali su alcuni effetti ancora poco considerati della vaccinazione in ambiti intensivi.

## 4.1 EZIOLOGIA

Il virus della bronchite infettiva è un *Gammacoronavirus*, appartenente al genere *Coronavirinae*, famiglia *Coronaviridae*, ordine *Nidovirales* (<http://talk.ictvonline.org/media/p/1230.aspx>). IBV possiede un nucleocapside a simmetria elicoidale e un *envelope* con delle caratteristiche proiezioni superficiali clavate dette *spike*. È un virus a RNA a singolo filamento orientato positivamente (ssRNA+), il cui genoma è lungo 27Kb e codifica per 4 proteine strutturali:

- proteina S o dello *spike*;
- proteina M o integrale di membrana;
- proteina E o dell'*envelope*, coinvolta nell'assemblaggio del virus;
- proteina N, che forma il nucleocapside.

Inoltre, il genoma codifica per diverse proteine non strutturali, solitamente 15 (Snijder & Siddell, 2008).

La proteina S è responsabile della adesione e fusione con le membrane e della penetrazione nella cellula ospite e risulta essere il principale determinante antigenico, responsabile della risposta anticorpale e cellulomediata (Casais et al., 2003). Questa proteina, dopo la trascrizione, viene clivata in due subunità, S1 e S2. IBV è caratterizzato da un'elevata diversità genetica, dovuta sia a fenomeni di mutazione che di ricombinazione. Ciò esita nel continuo emergere di nuove varianti di IBV, alcune circoscritte a livello temporale e geografico, altre invece diffuse a livello mondiale.

Sottotipi diversi possono differire per caratteristiche immunologiche, virulenza e tropismo, e possono essere classificati in base a diversi criteri: su base genetica, basandosi sulla sequenza del gene S1, si definiscono i vari genotipi e *lineage*; valutando la risposta immunitaria dei soggetti e l'eventuale cross-protezione si definiscono i protettotipi; e su base immunologica, in sierotipi che differiscono nella cross-reattività anticorpale. La classificazione sierologica non è però in grado di discriminare ceppi con similarità genetica superiore al 90% a livello di gene S1 (De Wit, 2000).

## 4.2 PATOGENESI

Il pollo (*Gallus gallus domesticus*) è l'unica specie in cui IBV causa sintomatologia. Tuttavia, numerose altre specie sono suscettibili all'infezione e coronavirus aviari simili a IBV sono stati ritrovati in fagiano (*Phasianus colchicus*) e pavone (*Pavo cristatus*) e isolati da tacchino (*Meleagris gallopavo*), alzavola (*Anas crecca*), oca (*Anserinae*), piccione (*Columba livia*), faraona (*Numida meleagris*), pernice (genere *Alectoris*), e anatre (famiglia *Anatidae*) (Cavanagh, 2005).

È possibile che alcuni di questi uccelli, specialmente i selvatici migratori, possano svolgere il ruolo di vettori per IBV (Cavanagh, 2007).

La malattia può colpire polli di qualsiasi età e tipo produttivo. Il virus diffonde rapidamente tra i capannoni, con morbilità quasi sempre del 100% e mortalità generalmente contenuta, ma che può raggiungere anche il 50% per i ceppi con tropismo renale o in caso avvengano sovra infezioni batteriche (Jackwood, 2012).

La trasmissione avviene per ingestione, per via inalatoria o per contatto diretto tra soggetti infetti e suscettibili. L'infezione è possibile anche per via indiretta tramite aerosol, il quale risulta essere la via maggiormente implicata, le feci o l'utilizzo di oggetti da lavoro contaminati (Jackwood & De Wit, 2017). La trasmissione verticale del virus alla progenie non è stata dimostrata, tuttavia il calo dell'ovodeposizione che si verifica a seguito dell'infezione e l'assenza di focolai spontanei di IB fanno presupporre che, qualora sia possibile, abbia poco significato nella pratica (Cook et al., 2012).

Il periodo di incubazione è di 24-48 ore fino all'apparire dei primi segni clinici a carico delle vie aeree superiori, dove avviene la prima localizzazione. Dopo una breve viremia il virus si può ritrovare a livello di polmoni, reni, ovaio, ovidutto e tonsille ciecali (Jackwood & De Wit, 2017). La fase clinica si risolve solitamente intorno alle 2 settimane post-infezione (Cook et al., 2012).

L'escrezione del virus è maggiore nella fase acuta della malattia, cioè nei primi 3-4 giorni, quando ci sono le più alte concentrazioni di virus in trachea. L'escrezione attraverso le feci può continuare fino a 20 settimane post-infezione e si possono verificare fenomeni di ri-escrezione del virus all'inizio o alla fine dell'ovodeposizione (Cook et al., 2012).

### 4.3 SEGNI CLINICI E LESIONI

La patogenicità di IBV dipende dal tropismo e dalla virulenza del ceppo interessato, dalla dose infettante, dalle condizioni immunitarie e fisiche dell'ospite.

Fattori di stress come alti livelli d'ammoniaca, dieta non adeguata, sovraffollamento, polvere, freddo e infezioni concomitanti aumentano la severità della malattia.

Il virus ha come target principali il tessuto epiteliale del tratto respiratorio superiore, dell'apparato riproduttivo e le cellule tubulari renali, con tropismo differente in base al ceppo (Jackwood & de Wit, 2017).

L'epitelio respiratorio risulta sempre coinvolto nella prima fase della malattia, portando alla manifestazione di sintomi come depressione, tosse, scuotimento della testa, scolo nasale e oculare. Negli individui giovani e/o debilitati si può arrivare a morte per asfissia, dovuta all'occlusione dei bronchi per via dell'accumulo di materiale caseoso causato dall'instaurarsi di infezioni batteriche secondarie, per lo più sostenute da *E. coli* (Matthijs et al., 2005).

Alla necropsopia si rinvencono tracheite, polmonite, sacchi aerei opachi e ispessiti (Figura 1).

Se l'infezione interessa l'apparato riproduttivo, IBV può provocare una diminuzione dell'ovodeposizione fino al 70% associata ad un forte calo della qualità delle uova, caratterizzate da guscio deforme e debole e albume acquoso (Box et al., 1980) (Figura 2). Il ritorno ai normali livelli di ovodeposizione si ha solitamente in 1-6 settimane (Jones & Jordan, 1971).



*Figura1) Infiammazione da lieve a moderata di trachea e bronchi. Accumulo di essudato caseoso in siringhe e bronchi primari (Cornell University).*



(a)



(b)

*Figura 2) Irregolarità in forma e dimensioni di uova ottenute da riproduttori infettati da IBV (a). Albume acquoso da gallina infettata con IBV ((b) a sinistra) a confronto con uovo normale ((b) a destra) (Bande et al., 2017).*

Se l'infezione avviene nelle prime fasi della vita della gallina, essa può esitare nella cosiddetta "sindrome della falsa ovaiole", con animali all'apparenza normali, ma che non deporranno mai uova. Nelle galline affette, alla necropsia si rinviene un

ovidotto cistico che non permette il normale passaggio dell'uovo, ma un ovaio normale (Figura 3).

L'età della gallina al momento dell'infezione è determinante per lo sviluppo di sintomatologia: Urban e Goodwin hanno dimostrato che se il contatto con il virus avviene tra le 10 e le 11 settimane di età, prima dell'entrata in deposizione, la produttività della gallina non viene compromessa, come accade invece nel caso avvenga tra le 19 e le 22 settimane, causando una perdita severa della produzione (Cook et al., 2012).

È stato inoltre ipotizzato che IBV possa rappresentare una possibile causa di infertilità nei maschi riproduttori, provocando calcoli epididimali e infiammazione, seppur in assenza di alterazioni istologiche (Boltz et al., 2004). Tuttavia, sono necessari degli studi più approfonditi in proposito.

I soggetti colpiti da ceppi di IBV nefropatogeni presentano depressione, penne arruffate, diarrea, polidipsia.

Alla necropsia si riscontra un aumento delle dimensioni dei reni che risultano pallidi ed edematosi e la presenza di urati nei tubuli collettori. Nei pulcini con meno di due settimane, alimentati con mangimi ricchi di calcio, è favorita l'insorgenza dell'urolitiasi e l'incremento della mortalità per insufficienza renale, soprattutto se si tratta di *broiler* (Cumming, 2008) (Figura 4).



*Figura 3) Dilatazione caratteristica dell'ovidotto indotta da ceppo QX (Benyeda et al., 2009)*



*Figura 4) Reni aumentati di volume con tubuli e ureteri distesi dalla presenza di urati all'interno (Cornell University)*

#### **4.4 DIAGNOSI**

Dato che i segni clinici indotti da IB non sono patognomonici, per confermare con certezza l'infezione si rendono necessari test di laboratorio.

Al giorno d'oggi sono disponibili diversi metodi diagnostici, ma nessuno di questi può essere considerato del tutto esaustivo, in quanto ognuno presenta vantaggi e svantaggi. Per queste ragioni, nello scegliere correttamente quale approccio utilizzare, deve essere preso in considerazione lo scopo a cui si mira.

L'isolamento virale viene eseguito mediante inoculazione di una sospensione di un campione di campo (ad esempio omogenato di organo o eluito ottenuto da tamponi) all'interno della cavità allantoidea di uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni di età; le uova vengono incubate e, dopo diversi passaggi che consentono al virus di adattarsi (di solito l'inoculazione iniziale non dà segni macroscopici evidenti a meno che questo non sia di un ceppo vaccinale e sia quindi già adattato a questo substrato), è possibile osservare le lesioni causate da IBV sugli embrioni.

Le lesioni tipiche apprezzabili consistono in nanismo e accartocciamento embrionale, con distrofia delle piume e accumulo di urati nel mesonefro (De Wit J.J. & Britton P., 2018) (Figura 5).

Tuttavia, altri virus, in particolare gli adenovirus, producono lesioni embrionali indistinguibili da quelle prodotte da IBV; per questo motivo l'isolamento del virus deve poi essere confermato tramite sierotipizzazione o genotipizzazione (De Wit, 2000).



*Figura 5) Confronto tra embrione normale di 16 giorni (a sinistra) e uno infetto rachitico e accartocciato della stessa età (a destra) (Jackwood & de Wit, 2017)*

Un altro substrato di coltivazione per IBV sono le colture di anelli tracheali di embrioni di pollo (TOC) preparate da embrioni di 19-20 giorni di età. L'infezione da parte di IBV di solito produce ciliostasi entro 24-48 ore, tuttavia questo effetto può essere prodotto da altri virus e anche in questo caso i risultati devono essere confermati con altri metodi (Cook et al., 1976; De Wit, 2000).

Ad oggi, per via della sua indaginosità e delle lunghe tempistiche necessarie per l'ottenimento di una diagnosi, l'isolamento virale è di fatto utilizzato solo per la propagazione del virus (Jackwood & De Wit, 2017) o per l'isolamento di particolari ceppi ai fini di una successiva caratterizzazione, solitamente effettuata tramite infezioni sperimentali.

I test sierologici come ELISA (*enzyme-linked immunosorbent essay*) o l'HI (*haemagglutination inhibition*) consentono la rilevazione e la titolazione di anticorpi specifici per IBV.

Esistono diversi kit commerciali basati sul metodo ELISA, ognuno con la propria modalità di interpretazione, e i loro risultati sullo stesso siero possono differire.

Grazie ad essi è teoricamente possibile associare la rilevazione di titoli anticorpali medi con una normale risposta alla vaccinazione, titoli anticorpali bassi con una vaccinazione non efficace e titoli elevati con l'esposizione al virus di campo. Tuttavia, vari fattori contingenti possono complicare l'interpretazione dei titoli sierologici.

I test ELISA attualmente in commercio non consentono la differenziazione tra le risposte anticorpali ai vari sierotipi, cosa possibile con i test di HI, i quali valutano la capacità di IBV di agglutinare i globuli rossi, per alcuni ceppi acquisita dopo un trattamento con neuroaminidasi (Schultze, 1992).

L'HI si rivela utile come metodo diagnostico di routine nel monitorare la risposta vaccinale. La sua utilità è però inficiata dal fatto che il siero di polli venuti in contatto con vaccini e ceppi di campo appartenenti a diversi sierotipi, contiene anticorpi reattivi contro ceppi antigenicamente non correlati. Per questo motivo utilizzare metodi sierologici in sospetti focolai di IB non dà risultati affidabili, in quanto gli anticorpi per un certo sierotipo potrebbero essere indotti da altri tipi di IBV (De Wit & Britton, 2018). Inoltre, un altro problema dei metodi sierologici si presenta nel valutare l'efficacia della vaccinazione in presenza di anticorpi di derivazione materna.

Attualmente le tecniche più utilizzate sono quelle biomolecolari, principalmente basate su RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), che permettono la rilevazione dell'RNA virale per valutare o per confermare un'infezione da IBV o la presenza e la replicazione di ceppi vaccinali. La positività alla RT-PCR

non significa necessariamente che il virus stia circolando attivamente e non fornisce informazioni sulla sua virulenza, per cui l'interpretazione dei risultati deve essere fatta in maniera attenta (Bande et al., 2016).

I principali vantaggi dei metodi biomolecolari sono le tempistiche rapide e la capacità di rilevare e discriminare una grande varietà di *lineage*, a seconda dei *primer* utilizzati (Jackwood & de Wit, 2017).

La determinazione del genotipo di un ceppo è un'informazione cruciale nella pianificazione di protocolli di vaccinazione efficaci. Inoltre, i virus che condividono parametri epidemiologici, temporali, geografici e antigenici tendono a ricadere in *lineage* specifici, un'informazione preziosa per valutare sia l'epidemiologia globale che la diffusione locale dell'IBV (Jackwood, 2012; Valastro et al., 2016).

La RT-PCR consente, inoltre, di differenziare ceppi di campo e ceppi vaccinali, sia indirettamente nel momento in cui si rileva un certo genotipo in una popolazione non vaccinata con il vaccino omologo, sia grazie a criteri genomici, basandosi su analisi filogenetiche o sul rilevamento di marcatori genetici (De Wit, 2000).

Nei test basati su RT-PCR, i *primer* sono solitamente disegnati sul gene S1, su una regione genomica comune a tutti i sottotipi di IBV o specifica per determinati *lineage* a seconda dello scopo perseguito (Valastro et al., 2016).

Le matrici più comunemente utilizzate per analisi di tipo molecolare sono tamponi orofaringei e tracheali, impronte dei tessuti *target* su *FTA card* oppure porzioni di organo tal quali.

Il campionamento e l'analisi di diversi siti è oltremodo utile, in quanto i ceppi rilevati in diversi distretti, anche se campionati allo stesso tempo, possono non coincidere a causa di un diverso tropismo.

I campioni possono essere processati individualmente o in *pool*. I primi sono indicati per valutare la copertura vaccinale all'interno di un gruppo di animali, mentre l'analisi in *pool* consente di ottenere informazioni sulla situazione epidemiologica dell'intero gruppo indagato in maniera più economica.

La scelta del tipo di PCR deve essere fatta in funzione dell'obiettivo che si persegue: la RT-PCR classica può essere seguita dal sequenziamento, consentendo la caratterizzazione del ceppo di IBV amplificato, mentre la RT-PCR *real time* fornisce

la quantità di RNA virale presente nel campione e i risultati possono essere ottenuti più velocemente, ma non permette il successivo sequenziamento.

Vista la frequente compresenza di vari ceppi, sia di campo che vaccinali in uno stesso gruppo, ad essere sequenziato è solitamente uno di essi, solitamente quello prevalente o con la maggior affinità per i *primer* utilizzati, ma anche per questo motivo, quando sono presenti più ceppi, i risultati ottenuti da diversi laboratori, che magari non utilizzano il medesimo protocollo diagnostico, possono non coincidere. Infine, per una robusta classificazione dei ceppi di IBV, il sequenziamento dovrebbe essere condotto sull'intero gene S1 (Valastro et al., 2016).

In definitiva, per l'ottenimento di una diagnosi attendibile è sicuramente utile impiegare diverse metodiche (Jackwood & De Wit, 2017). Per una migliore interpretazione dei risultati, è inoltre necessario tener conto di informazioni anamnestiche come età al campionamento, presenza di sintomi, protocollo vaccinale, posizione dei capannoni e virus circolanti nel territorio.

## **4.5 DISTRIBUZIONE**

Il virus della bronchite infettiva è diffuso a livello globale: IBV è stato, infatti, individuato in tutti i continenti tranne l'Antartide (de Wit et al., 2011).

A partire dalla sua prima scoperta negli Stati Uniti, nel corso degli anni è stata identificata una moltitudine di varianti virali, alcune di esse diffuse in varie parti del globo, altre rimaste endemiche (Figura 6). La contemporanea circolazione di più varianti nello stesso territorio e nella stessa popolazione è assolutamente comune, così come la co-infezione dello stesso animale da parte di diversi ceppi (Cook et al., 2012).

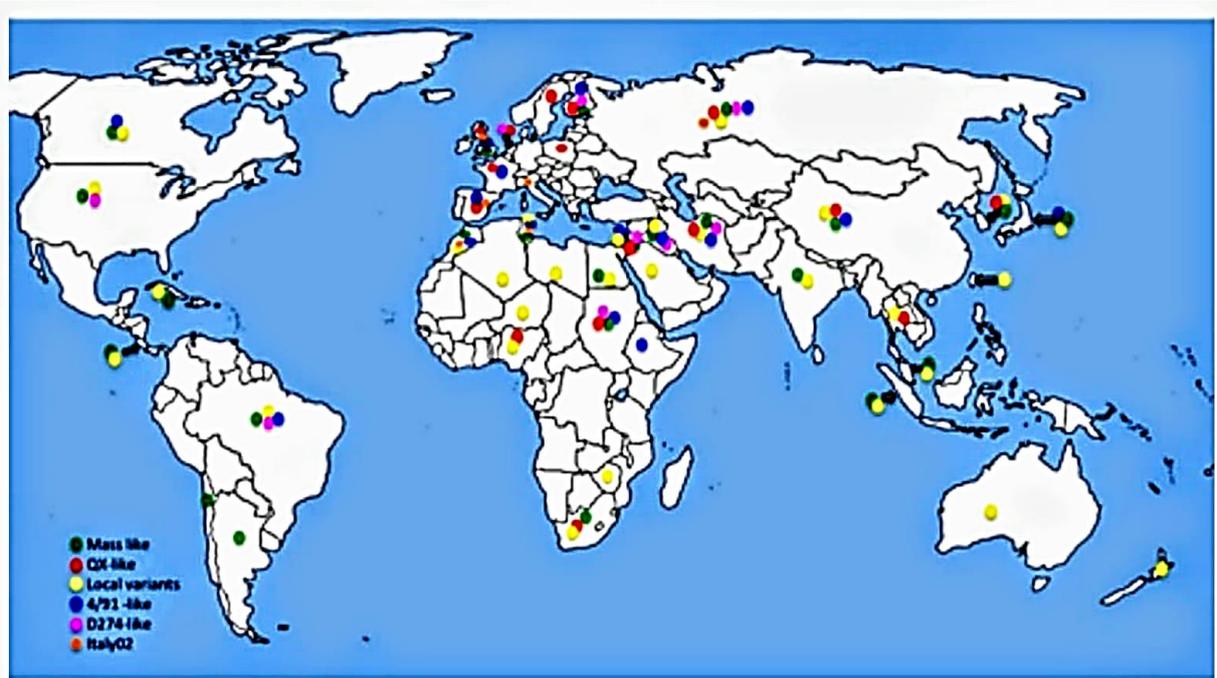


Figura 6) Distribuzione dei principali sierotipi IBV (Cook et al., 2012).

Grazie alla ricostruzione filogenetica basata sul sequenziamento completo della porzione S1 dello *spike*, attualmente si riconoscono 6 genotipi, i quali a loro volta comprendono 32 *lineage* insieme ad una serie di varianti ricombinanti di essi (Valastro et al., 2016).

#### 4.6 STRATEGIE DI CONTROLLO

Al fine di controllare l'introduzione e la diffusione di agenti patogeni come IBV, è utile applicare un management mono-età e stringenti procedure di biosicurezza, tra cui accurate pratiche di pulizia e disinfezione e di "tutto pieno-tutto vuoto" (Jackwood & de Wit, 2017).

Per contrastare IBV, sono attualmente in uso sia vaccini vivi attenuati che inattivati, applicati routinariamente nei sistemi intensivi di quasi tutto il mondo. I vaccini vivi attenuati vengono abitualmente utilizzati nei *broiler*, in modo che sviluppino la risposta anticorpale in maniera precoce, e per il *priming* delle ovaiole e dei riproduttori, che riceveranno in seguito delle dosi *booster* di vaccino inattivato, in modo da mantenere l'immunità per tutta la vita produttiva. La durata della risposta alla vaccinazione viva è variabile, ma in condizioni ottimali può arrivare a diversi mesi e nel caso dei *broiler* è solitamente a vita (Bijlenga et al., 2004).

Nelle aree con forte circolazione di virus di campo, i vaccini vivi possono però essere utilizzati anche in dosi successive per mantenere alta l'immunità locale delle vie respiratorie (de Wit et al., 2011).

Il livello di cross-protezione tra diverse varianti di IBV è generalmente basso. Le strategie adottabili per ottenere una protezione soddisfacente si basano sostanzialmente su due approcci: si possono utilizzare vaccini omologhi, basati sul medesimo *lineage* del ceppo di campo circolante, oppure eterologhi, somministrando varianti antigenicamente differenti dal ceppo circolante, tipicamente in combinazione al fine di ampliare lo spettro di protezione (Cook et al., 1999; Terregino et al., 2008). L'effetto sembra essere maggiore se i due vaccini vengono applicati a distanza (solitamente di due settimane) e non combinati, anche se la ragione alla base della diversa efficacia nella protezione in base alla somministrazione combinata o separata è tutt'ora poco chiara (De Wit et al., 2011).

L'applicazione del vaccino può avvenire per goccia oculare, goccia nasale, spray o attraverso l'acqua d'abbeverata. L'assunzione adeguata dello stesso è essenziale per scongiurare la circolazione del virus nei capannoni, la quale incrementa il rischio di infezioni secondarie (Hopkins & Yoder, 1984) e dà la possibilità al virus di rivirulentare (Hopkins & Yoder, 1986).

#### **4.7 IL *LINEAGE* QX (GI-19)**

Al giorno d'oggi, il *lineage* GI-19, più comunemente conosciuto come QX, rappresenta il sottotipo genetico più rilevante per perdite prodotte e diffusione, in diversi Paesi europei, tra cui l'Italia (Franzo et al., 2014). È stato segnalato per la prima volta in Cina nel 1996 (Yu et al., 2001), per poi essere riscontrato in Russia (Bochkov et al., 2006; Ovchinnikova et al., 2011) e Medio Oriente (Abdel-Moneim et al., 2006; Bozorgmehri-Fard et al., 2013; Seger et al., 2016) ed, infine, è stato introdotto in Europa, probabilmente in Germania, per la prima volta intorno al 2002 (Franzo et al., 2017) (Figura 7).

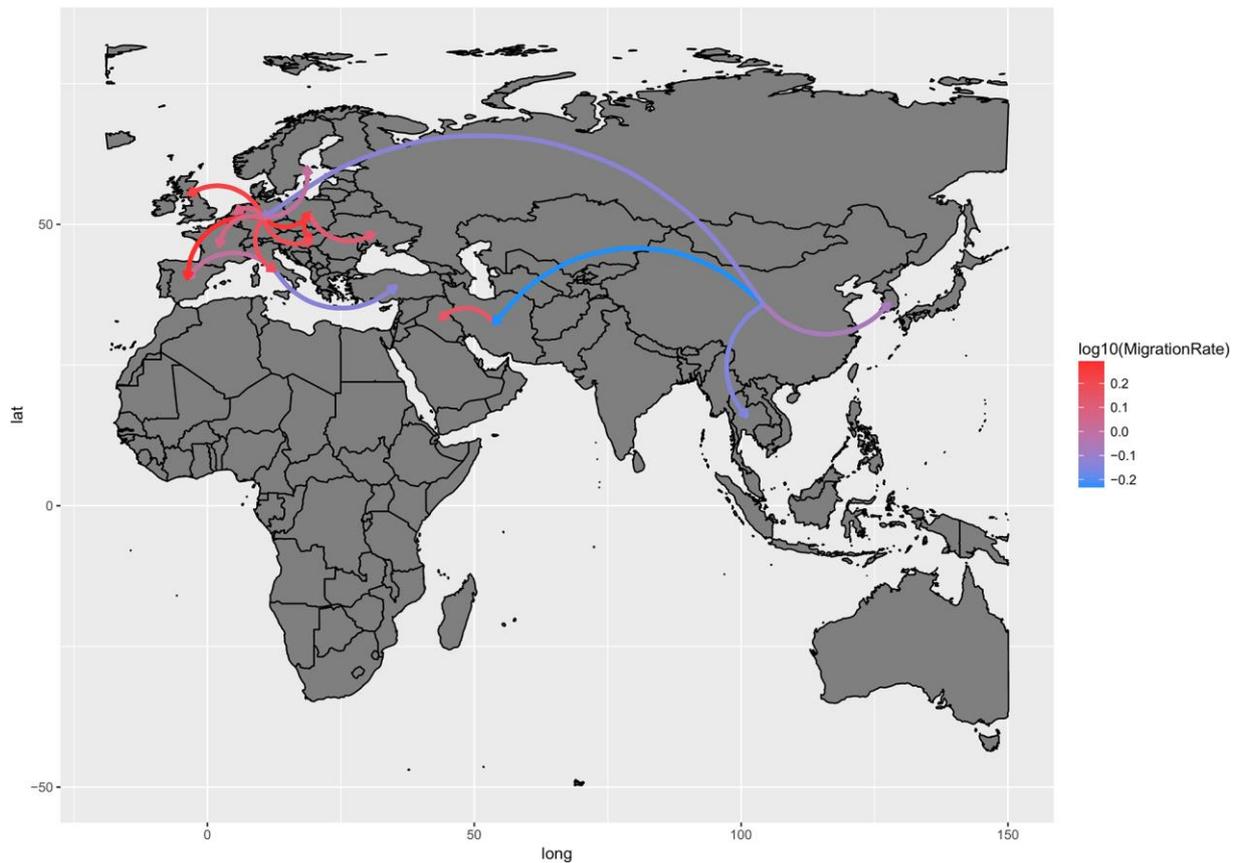


Figura 7) Percorsi di migrazione QX. Le frecce indicano la direzionalità del processo mentre il colore è proporzionale al logaritmo in base 10 del tasso di migrazione (Franzo et al., 2017)

L'introduzione di QX in Italia sembra risalire al 2003, in Emilia Romagna, con una successiva diffusione in tutto il Paese (Franzo et al., 2017). Sebbene vi sia la circolazione di altri *lineage*, QX è quello maggiormente coinvolto nello sviluppo di focolai (72%), seguito da 793B (16%), Mass (8%), Q1 (3%) e D274 (1%) (Franzo et al., 2014).

Nelle prime segnalazioni cinesi, il virus venne associato a fenomeni di proventricolite (YuDong et al., 1998) e successivamente anche a nefrite (Liu & Kong, 2004), difficoltà respiratorie e alla sindrome della "falsa ovaiola" (Yu et al., 2001).

Sebbene tutti i ceppi QX-like isolati successivamente fossero geneticamente correlati al QX cinese, i segni clinici e le lesioni si sono dimostrate variabili. Lo stesso si può dire per la mortalità e la morbilità che sono risultate eterogenee tra capannoni e indipendenti dall'utilizzo della vaccinazione contro IB (Benyeda et al., 2009).

Tuttavia, in generale, la malattia provocata da QX risulta più severa rispetto a quella provocata dagli altri ceppi e induce titoli anticorpali più elevati (Benyeda et al., 2009).

È stato dimostrato sperimentalmente che l'utilizzo di vaccini eterologhi in combinazione, può arginare il diffondersi di QX pur non inducendo un'immunità "sterilizzante" (Terregino et al., 2008).

La combinazione di vaccini Mass e 793B, di comune adozione in Italia (Franzo et al., 2016), si è dimostrata efficace in ambito sperimentale nei confronti di QX (Terregino et al., 2008), ma non si hanno dati raccolti in condizioni di campo. Tuttavia, uno studio comparativo su base statistica, svolto da Franzo et al. nel 2016, ha dimostrato che in Spagna, dove si è utilizzato il suddetto protocollo vaccinale, la popolazione di QX è rimasta costante nel periodo oggetto di studio, mentre in Italia, dove per un certo periodo di tempo le aziende hanno smesso di vaccinare per 793B, si è osservato un aumento dei focolai di QX.

A partire dal 2014 è stato inoltre introdotto in Italia un vaccino omologo per QX che è stato provato essere efficace nella riduzione della popolazione virale omologa e anche nel numero dei focolai osservati in campo (Franzo et al., 2016).



## 5 MATERIALI E METODI

---

### 5.1 SELEZIONE DEI CAMPIONI

La ricerca di IBV QX è stata condotta su *pool* di tamponi tracheali prelevati tra il 2012 ed il 2017 in una delle maggiori filiere produttive italiane.

Sono stati presi in considerazione campioni risultati positivi per IBV durante la routinaria attività diagnostica e successivamente caratterizzati come appartenenti al *lineage* GI-19 (genotipo QX) sulla base della sequenza di una regione ipervariabile del gene S1.

I campioni tal quali (i.e. stemperato dei tamponi tracheali in 2 ml di PBS) erano stati conservati a -80°C. Per la catalogazione delle informazioni disponibili in merito a ciascun campione e degli esiti delle analisi è stato predisposto un apposito database in Microsoft Excel, contenente le seguenti voci:

- Identificativo del campione;
- Anno di raccolta;
- Tipo di matrice;
- Eventuale presenza di sintomatologia e/o lesioni;
- Località di raccolta;
- Nome dell'allevamento;
- Esito della RT-PCR e del successivo sequenziamento.

### 5.2 ESTRAZIONE DELL'RNA VIRALE

L'RNA virale è stato estratto utilizzando il kit commerciale High Pure Viral RNA kit (ROCHE, Basilea, CH) secondo le istruzioni della ditta produttrice. Gli estratti sono stati poi conservati a -80°C.

### 5.3 DISEGNO DEI PRIMER

Per poter sequenziare l'intero gene S1 si è reso necessario utilizzare due coppie di *primer*, una (XCE1+ e XCE2-) generica per IBV e ottenuta dalla letteratura

(Cavanagh et al., 1999) e l'altra (QXS1F+ e QXS1R-) disegnata per questo studio e specifica per QX.

Per il disegno dei *primer* ci si è avvalsi del programma Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), per poi valutarne la specificità con Primerblast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e accertarsi che la complementarietà intra- e fra *primer*, nonché la probabilità di formazione di strutture secondarie, fosse bassa utilizzando il software OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Le sequenze dei diversi *primer* sono mostrate in tabella 1.

PRIMER	SEQUENZA
XCE1+	5'-CACTGGTAATTTTTCAGATGG-3'
QXS1R-	5'-TGTGTTTGTATGTACTION-3'
QXS1F+	5'-TGGGTGACAGTGGAAACTG-3'
XCE2-	5'-CTCTATAAACACCCCTTACA-3'

Tabella 1) Sequenza delle due coppie di *primer* utilizzati.

## 5.4 PROTOCOLLO DI RT-PCR

Le RT-PCR *one-step* sono state eseguite usando il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ TaqDNA Polymerase kit (Thermo Fisher, Waltham, MA).

Per ciascun campione sono state effettuate due reazioni utilizzando le due diverse coppie di *primer* (XCE1+ insieme a QXS1R- e QXS1F+ con XCE2-). Nello specifico, a 5 µl di RNA venivano addizionati 20 µl di mix di reazione composta da 12,5 µl di 2X Reaction Mix, 0,6 µM di ciascun *primer*, 1 µl di SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix e acqua da biologia molecolare fino al raggiungimento del volume finale di reazione.

Per assicurare un'elevata specificità nelle fasi iniziali della reazione, si è deciso di impiegare un protocollo di tipo *touchdown*, in cui la temperatura di *annealing* partiva da 55 °C e andava progressivamente decrescendo di 0,5°C per ciclo fino a raggiungere i 50 °C.

Il protocollo termico è illustrato in tabella 2.

FASE	SETTAGGIO	CICLI
RETROTRASCRIZIONE	50°C per 30'	
PRE-DENATURAZIONE	95°C per 2'	
DENATURAZIONE	95°C per 20"	x9
ANNEALING	TD 55°C-50°C* per 20"	
ESTENSIONE	68° per 50"	
DENATURAZIONE	95°C per 20"	x36
ANNEALING	50°C per 20"	
ESTENSIONE	68° per 50"	
ESTENSIONE FINALE	68° per 50"	
* touchdown: partendo da 55°C la temperatura di annealing diminuisce di 0,5°C per ciclo fino a		

Tabella 2) Protocollo termico della RT-PCR touchdown.

## 5.5 ELETTROFORESI SU GEL E LETTURA DEI RISULTATI

I prodotti di PCR, addizionati con l'addensante 6X DNA Gel Loading Dye® (Thermo Fisher, Waltham, MA), sono stati caricati su gel di agarosio 2% in cui era stato disciolto l'agente intercalante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher, Waltham, MA).

La corsa elettroforetica, della durata di 15 minuti, si è svolta ad una tensione di 100V, dopodiché i risultati sono stati visualizzati con un transilluminatore Gel Doc XR System® (Bio-Rad Hercules, CA) utilizzando il programma Image Lab™ Software (Bio-Rad, Hercules, CA).

## 5.6 SEQUENZIAMENTO

I campioni positivi sono stati inviati ad un laboratorio esterno per essere sequenziati con metodo Sanger impiegando tutti e quattro i *primer* utilizzati nelle RT-PCR.

I cromatogrammi così ottenuti, dopo un *trimming* ed una prima valutazione svolti con FinchTV (<http://www.geospiza.com>), sono stati utilizzati per assemblare un'unica sequenza consenso con ChromasPro 1.5 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>), in modo da coprire l'intera lunghezza del gene S1.

## **5.7 ALLINEAMENTO E GENOTIPIZZAZIONE**

Le sequenze sono state allineate a livello aminoacidico e riconvertite in sequenze nucleotidiche usando l'algoritmo MAFFT integrato in TranslatorX (Abascal et al., 2010).

L'appartenenza al *lineage* QX è stata confermata tramite comparazione con un database che includeva i più comuni ceppi vaccinali e le sequenze di referenza proposte da Valastro et al. (2016).

## **5.8 ANALISI DELLA PRESSIONE SELETTIVA PERVASIVA ED EPISODICA**

Le sequenze italiane sono state suddivise in due *subset* a seconda che la loro origine fosse antecedente o successiva all'inizio del 2015, ossia del momento in cui il vaccino basato su QX è stato introdotto nella filiera oggetto di studio.

La presenza di fenomeni di selezione purificante o diversificante di tipo pervasivo è stata accertata utilizzando i metodi SLAC, FEL e FUBAR (Kosakovsky et al., 2005; Murrell et al., 2013).

I metodi MEME e FEEDS sono stati usati per accertare la presenza di pressione episodica diversificante (Murrell et al., 2012a), mentre forme di pressione episodica direzionale sono state valutate utilizzando MEDS (Murrell et al., 2012b).

Tutte le analisi sono state svolte con il software HyPhy (Kosakovsky et al, 2005b), e settando il livello di significatività statistica a  $P < 0.1$ , mentre per il metodo FUBAR la soglia della probabilità a posteriori è stata impostata a 0.9.

## **5.9 HOMOMOLOGY MODELING DELLA SUBUNITÀ S1**

La sequenza del gene S1 di un ceppo QX italiano (30626|16/12/2014|Post) è stata convertita a livello aminoacidico, e il web server SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) è stato utilizzato per stimarne la struttura proteica quaternaria tramite un approccio di *homology modeling* basato su un modello di referenza, determinato sperimentalmente, dello *spike* di IBV (pdb template:6CV0).

Il modello ottenuto è stato poi visualizzato e modificato con il software *Chimera* (Pettersen et al., 2004).

## 6 RISULTATI E DISCUSSIONE

---

### 6.1 CAMPIONI E SEQUENZIAMENTO

I campioni preliminarmente identificati come appartenenti al *lineage* QX sono risultati essere 155. Per 95 di questi è stato possibile ottenere una sequenza dell'intero gene S1.

Le sequenze ottenute sono state allineate e confrontate con la sequenza del gene S1 di uno dei ceppi vaccinali GI-19 attualmente registrati in Italia, e quattro di esse, appartenenti a campioni raccolti nel periodo post-vaccinale, sono state rimosse dal dataset in quanto identiche al ceppo vaccinale (D388).

Un'ulteriore sequenza è stata inoltre esclusa in quanto dimostratasi l'esito di un evento di ricombinazione tra ceppi QX e 793B.

Il dataset totale, composto di 90 sequenze, è stato diviso in due *subset*, comprendenti uno 39 e l'altro 51 sequenze, corrispondenti rispettivamente al periodo pre- e post-vaccinazione.

Prima del 2015, nella filiera oggetto di studio gli animali venivano immunizzati di routine con vaccino spray per Mass in incubatoio (ad 1 giorno di vita) e in seguito con 793B attraverso l'acqua di abbeverata (a 14 giorni di vita).

A partire dall'inizio del 2015, la vaccinazione basata su 793B è stata sostituita da un vaccino QX. Il *subset* post-2015 era caratterizzato da una distanza genetica lievemente maggiore rispetto a quello pre-2015, ma non si trattava di una differenza significativa.

Tutte le sequenze ottenute sono state caricate su GenBank (*Accession Numbers* MK491671-MK491761).

### 6.2 ANALISI DELLA PRESSIONE SELETTIVA PERVASIVA ED EPISODICA

Secondo la teoria neutrale dell'evoluzione molecolare, la maggior parte delle mutazioni che avvengono nel genoma non portano a un cambiamento nella *fitness* degli organismi. Le motivazioni sono due: la prima è che, essendo il codice genetico

degenerato, la mutazione potrebbe codificare per lo stesso amminoacido o per un amminoacido con le stesse caratteristiche; la seconda è che la mutazione potrebbe causare un peggioramento di *fitness* tale da scomparire immediatamente con la morte del soggetto portatore (Kimura, 1968).

Le nuove mutazioni possono aumentare di frequenza nella popolazione grazie all'azione del caso, causando la cosiddetta deriva genetica.

Secondo la teoria darwiniana, la maggior parte delle mutazioni, invece, incide sulla *fitness* degli organismi e su di esse agisce la selezione naturale (Gillespie JH., 1991). Questa, agendo soprattutto sulle posizioni del genoma che hanno importanza funzionale, fa sì che la sua analisi possa essere utilizzata per identificarle (Nielsen, 2005).

Utilizzando un sistema di lettura del DNA per codoni, è possibile identificare mutazioni non sinonimo (dN), che determinano un cambiamento di AA, oppure sinonimo (dS), che non lo determinano.

Quando il tasso di mutazioni dS è superiore a quello delle dN, il sito è sottoposto a pressione purificante. Ciò accade quando una mutazione è svantaggiosa: verrà in breve tempo eliminata dalla selezione naturale e l'AA tenderà ad essere conservato (Delpont et al., 2008).

Quando il tasso di mutazioni dN supera quello delle dS, si può dire che il sito è sottoposto a pressione diversificante o positiva. Questo avviene nel caso in cui una mutazione sia vantaggiosa: tenderà ad aumentare di frequenza e a fissarsi nella popolazione, portando all'evoluzione adattativa della proteina (Delpont et al., 2008).

In questo studio, abbiamo voluto testare quanto e se l'introduzione della vaccinazione omologa per QX avesse condizionato l'evoluzione del virus della bronchite infettiva.

Abbiamo pertanto valutato la presenza di eventuali differenze nella pressione selettiva tra i due *subset* creati; è stata stimata, per ogni posizione di codone delle sequenze allineate, la differenza standardizzata tra le mutazioni dN e dS prima e dopo l'introduzione della vaccinazione, utilizzando i metodi statistici FUBAR, FEL e SLAC.

Quando il punteggio ottenuto ( $dN-dS$ ) risultava superiore a zero (in corrispondenza di una maggioranza di mutazioni  $dN$ ) il sito era sottoposto a una pressione selettiva diversificante, anche chiamata, per questo, positiva; quando il punteggio ottenuto era inferiore a zero, il sito tendeva a rimanere conservato, era dunque sottoposto a pressione selettiva purificante, anche chiamata negativa (Anisimova & Kosiol, 2007). I metodi statistici utilizzati presuppongono che la pressione selettiva agisca in maniera costante e sia, cioè, di tipo pervasivo.

Con tutti e tre i metodi statistici utilizzati, i valori superiori allo zero sono apparsi essere predominanti nel periodo post-vaccinazione, come è possibile vedere nella Figura 8.

Utilizzando questi tre metodi statistici, non è stato possibile dimostrare in modo consistente la presenza di pressione diversificante pervasiva, in quanto solo tramite FUBAR sono stati classificati come positivi alla selezione pervasiva i codoni 52, 54, 58, 65 e 132 in entrambi i *subset* e i codoni 9, 64, 389 e 539 solo in quello post-vaccinazione.

I valori ottenuti con le diverse analisi sono stati utilizzati per calcolare un punteggio cumulativo, sommando i valori ottenuti codone per codone, in modo da evidenziare la tendenza alla diversificazione nelle varie regioni di S1 nei due periodi di tempo considerati. Le regioni di S1 caratterizzate da valori  $dN-dS$  superiori a zero sono risultate essere in numero maggiore nel periodo post vaccinale, soprattutto nell'area tra gli amminoacidi 300 e 400, come si può constatare dalla Figura 9.

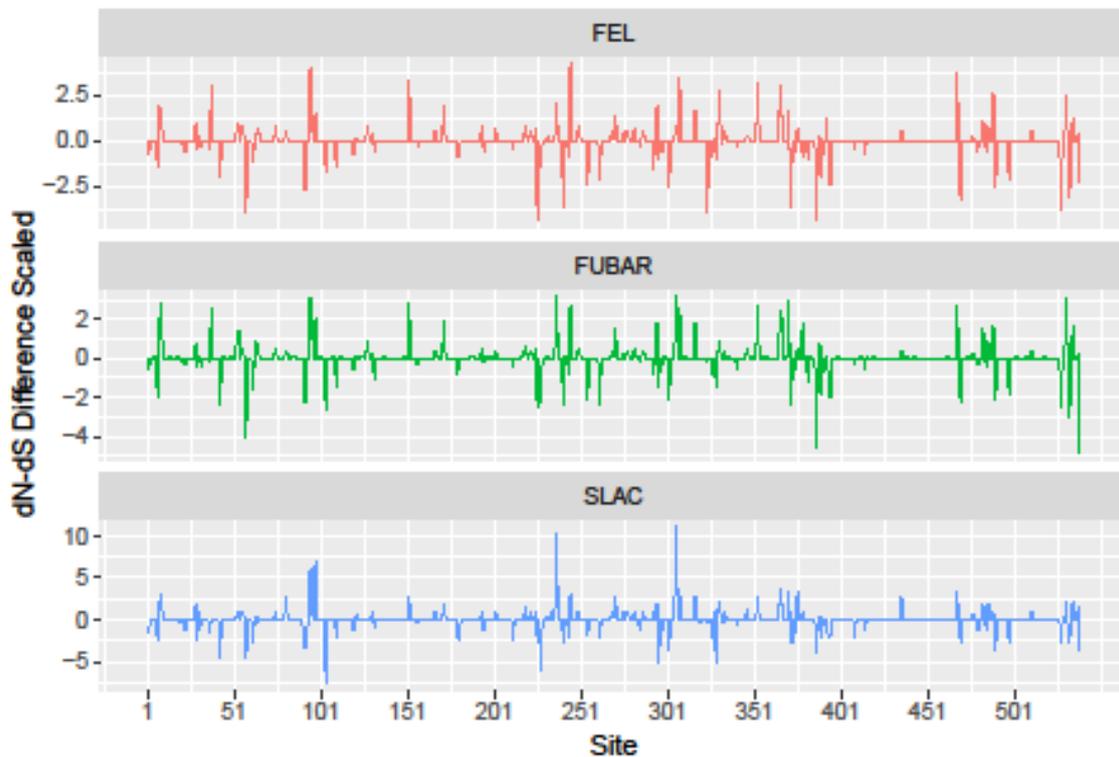


Figura 8) Plot rappresentante, per ogni codone, le differenze nello score standardizzato dN-dS (calcolato con 3 distinti approcci statistici) fra il periodo post- e pre-vaccinazione. Punteggi maggiori di 0 indicano una più intensa pressione selettiva nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione omologa.

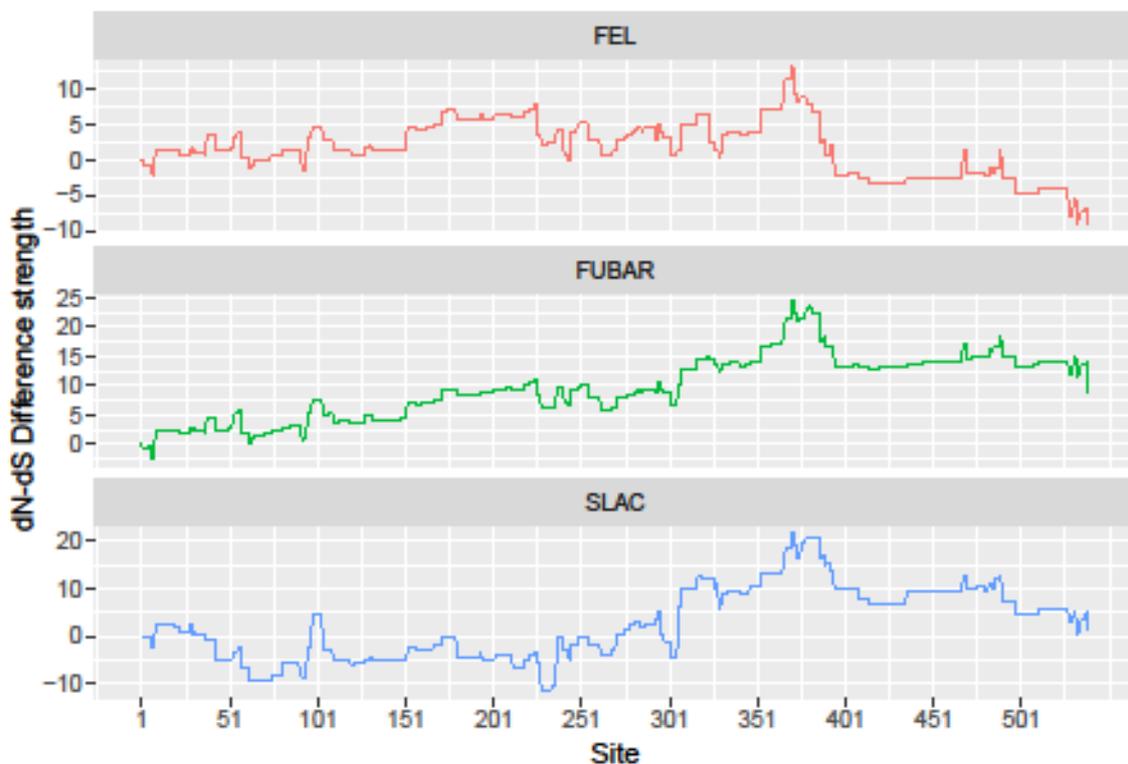


Figura 9) Plot rappresentante lo score cumulativo (calcolato con 3 distinti approcci statistici) basato sulla differenza fra tasso di mutazioni non sinonimo e sinonimo (dN-dS) nel periodo precedente e successivo all'introduzione della vaccinazione omologa. Punteggi maggiori di 0 indicano una più intensa pressione selettiva nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione omologa.

A questo punto si è testata la presenza di pressione selettiva diversificante episodica, che interessa cioè solo determinati intervalli di tempo. Questa è stata valutata utilizzando il metodo statistico MEME: gli unici siti identificati come positivi alla selezione episodica appartenevano al *subset* post-vaccinazione, in particolare si trattava delle posizioni 9, 29, 54, 65, 96 e 483. I risultati ottenuti con MEME concordavano parzialmente con quelli ottenuti con il metodo FEEDS (aa 9, 65, 225, 483).

Si è giunti poi a valutare la presenza della pressione selettiva direzionale episodica. La pressione selettiva direzionale tende ad eliminare le variazioni nella popolazione selezionando il fenotipo con maggior *fitness* (Nielsen, 2005). Rifacendosi alla distribuzione normale, si assiste allo spostamento di questa, nel corso delle generazioni, verso l'estremità che corrisponde al fenotipo più adatto; nel caso dell'RNA virale, sono favorite le sostituzioni verso uno o più amminoacidi target (Pond et al., 2012). Questa è stata stimata con il metodo MEDS ed è stata dimostrata a livello degli amminoacidi 29, 394 e 489 nel periodo post-vaccinazione, i quali mostravano la tendenza a mutare rispettivamente verso l'asparagina (N), la treonina (T) e la valina (V).

### **6.3 HOMOLOGY MODELING**

La struttura quaternaria della proteina S1 di un ceppo GI-19 italiano è stata stimata sulla base di un modello di riferimento dello *spike* di IBV. Grazie al modello così ottenuto (Figura 10) è stato possibile mappare i siti sottoposti a pressione selettiva.

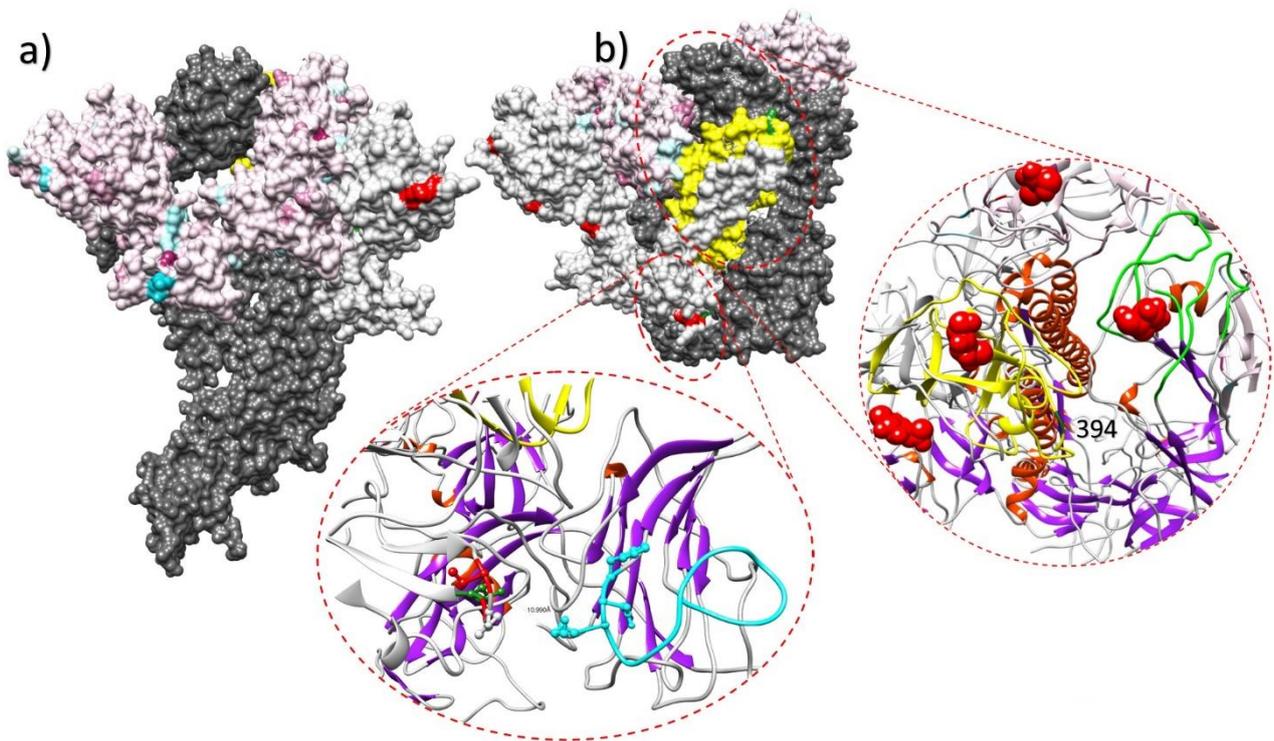


Figura 10) Vista laterale (a) e dall'alto (b) della struttura quaternaria dello Spike di IBV. La struttura completa dello Spike è riportata solamente per un monomero (in grigio), mentre la regione dell'S1 è riportata per i restanti 2 monomeri. Nel monomero colorato, le differenze nelle pressioni selettive fra il periodo precedente e successivo all'introduzione della vaccinazione sono state codificate con una scala colori dal viola (più intense nel periodo post-vaccinazione) all'azzurro (più intense nel periodo pre-vaccinazione). Nel restante monomero (bianco), i siti sottoposti a pressioni episodiche diversificanti o direzionali nel periodo post-vaccinazione omologa sono riportati rispettivamente in rosso e verde. La regione con il più alto dN-dS score (AA 300-400) (vedi anche Figura 9) è evidenziata in giallo. Con una visualizzazione a "ribbon" sono stati evidenziati i domini proteici più rilevanti: l'insero inferiore riporta il sito di legame recettoriale nell'N-terminale della proteina e la struttura ad ansa che funge da "copertura" (in azzurro), mentre l'insero sulla destra riporta il dominio C-terminale con il corrispondente sito recettoriale (in verde). Per entrambi gli inserti i siti sottoposti a pressioni selettive sono evidenziati con il codice colore precedentemente descritto.

In figura è possibile vedere l'intera proteina spike di IBV, in visione laterale (a) e nella sua parte superiore (b). La regione S1 della proteina, corrispondente ai due monomeri colorati, è stata evidenziata con colori differenti in base alla pressione selettiva a cui sono stati sottoposti i vari siti, calcolata da FUBAR. Nel monomero colorato, le differenze in termini di score dN-dS tra il periodo pre-vaccinazione e quello post-vaccinazione sono state rappresentate da una scala di colori che va dal

viola (maggior pressione nel periodo post-vaccinazione) all'azzurro (maggior pressione nel periodo pre-vaccinazione), rispettivamente. Nel monomero in bianco, i siti sottoposti a pressione episodica diversificante e direzionale sono evidenziati rispettivamente in rosso e in verde.

Dalla figura è possibile notare che la maggior parte degli amminoacidi di superficie è soggetta a una maggior pressione selettiva diversificante nel periodo post-vaccinazione, il che ha permesso di ipotizzare che la risposta immunitaria dell'ospite possa avere un ruolo nel condizionare l'evoluzione del virus.

La regione con il più alto punteggio cumulativo dN-dS tra il periodo pre- e post-vaccinazione (evidenziata in giallo nella figura b) corrispondeva a un dominio C-terminale (CTD) esposto sulla superficie dello *spike*, dove si presume siano localizzati due siti di legame con il recettore (RBM) (in verde nella figura 10-b) e che è coinvolto nell'emergenza di varianti genotipiche resistenti alla vaccinazione (Kant et al., 1992). Ciò sembra suggerire che gli anticorpi anti-RBM possano avere una forte attività neutralizzante e quindi spingere per la diversificazione virale. A sostegno di quanto detto, nel CTD si trova l'amminoacido 394 (evidenziato nell'ingrandimento a destra) che, dalle analisi precedenti, è risultato sottoposto a pressione selettiva direzionale assieme agli amminoacidi 486 e 29. Similmente all'aa 394, l'amminoacido 486 è in stretta relazione con un altro sito RBM nel dominio N-terminale (NTD) di S1 nella subunità adiacente (nell'ingrandimento a sinistra). L'amminoacido 29, contrariamente agli altri due, si trova all'interno della struttura della proteina.

Altre regioni della proteina che si sono dimostrate essere sottoposte a pressione selettiva nel presente studio sono localizzate all'interno o nelle immediate prossimità del CTD. Tra queste figurano le regioni tra gli amminoacidi 24-62 e 87-93, che sono state classificate come epitopi in studi sperimentali precedenti. In particolare, è stato dimostrato che la regione 87-93 è un sito antigenico specifico del *lineage* QX (GI-19) (Zou et al., 2015).

Inoltre, due differenti amminoacidi risultati essere sottoposti rispettivamente a pressione selettiva diversificante (aa 483 rappresentato in rosso) e direzionale (aa 486 rappresentato in verde) sono situati nelle immediate prossimità di una serie di foglietti beta (rappresentati in azzurro nell'ingrandimento a sinistra) che costituiscono

un tetto sul dominio N-terminale di S1. Poiché il NTD è un importante bersaglio della risposta immunitaria dell'ospite, l'evoluzione di questa struttura a tetto sembra assolvere ad una funzione di protezione per questo sito di legame per gli zuccheri (Shang et al., 2018). Di conseguenza, gli anticorpi neutralizzanti, legandosi alla subunità adiacente nei siti degli amminoacidi 483-486, potrebbero creare un'interferenza sterica nei confronti del tetto protettivo del sito di legame, anche se non può essere escluso che i suddetti amminoacidi siano coinvolti in maniera diretta nella risposta immunitaria dell'ospite.

## 7 CONCLUSIONI

---

In questo lavoro si è svolta un'indagine su larga scala per valutare il potenziale ruolo della vaccinazione nell'influenzare l'evoluzione di IBV genotipo QX (GI-19) in condizioni di campo confrontando, in termini di pressione selettiva, il periodo antecedente e quello successivo all'introduzione di un vaccino omologo in una delle maggiori filiere italiane.

I vaccini sono ritenuti poco suscettibili a fenomeni di resistenza per diversi motivi. Essi inducono una risposta immunitaria *multi-target*, per cui ad un virus non basta mutare in un solo amminoacido per eludere lo spettro anticorpale dell'ospite (G. Cook, 2000). Il loro meccanismo d'azione tende, inoltre, a prevenire l'emergere di nuove varianti in quanto diminuisce il numero di ospiti suscettibili nella popolazione o annulla la replicazione virale e l'escrezione. Inoltre, ogni individuo ha una risposta immunitaria peculiare dovuta al proprio patrimonio genetico o a situazioni concomitanti, aumentando così la probabilità di neutralizzazione virale a livello di popolazione.

Tuttavia, diversi studi, incluso il presente, hanno dimostrato rimarcabili eccezioni in medicina veterinaria, soprattutto nell'ambito dell'allevamento intensivo: gli animali allevati sono soggetti simili dal punto di vista genetico, con una grande uniformità nella risposta immunitaria e hanno vita breve.

Questo comporta che il virus si confronti più spesso con l'immunità vaccinale piuttosto che con l'immunità naturale, più eterogenea.

Va inoltre considerato che i virus a RNA come IBV, evolvendo rapidamente, sembrano essere favoriti nello sfuggire alle strategie di controllo (Kennedy & Read, 2017).

Infine, essendo la vaccinazione per IBV non "sterilizzante", al virus è consentito di replicare anche in animali vaccinati, di adattarsi e di diffondersi (Terregino et al., 2008).

In situazioni in cui la copertura vaccinale non è omogenea, fenomeno che si osserva frequentemente in condizioni di campo (Franzo et al., 2016), è probabile che il virus riesca a circolare in una parte di popolazione abbastanza grande da provocare

l'emergenza e la selezione di nuove varianti che possiedono la combinazione di mutazioni necessaria a rendere meno efficace la vaccinazione (Kennedy & Read, 2017).

Nel presente studio, grazie alla raccolta di campioni su larga scala e all'approccio epidemiologico su base statistica, è stato possibile studiare un modello di evoluzione virale in ambiente naturale, minimizzando gli effetti dovuti alle condizioni sperimentali, alle linee genetiche, allo stato di salute dei soggetti, alla dose infettante e al ceppo virale. Inoltre, sono stati inclusi nello studio, sia pre- che post-vaccinazione, allevamenti diversi, ma situati nella stessa area geografica e appartenenti alla stessa filiera, il che ha permesso di evitare peculiarità dei capannoni o situazioni contingenti.

Dai risultati ottenuti, si evince una maggior tendenza alla diversificazione nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione omologa. Si può ipotizzare che ciò sia dovuto al fatto che la risposta immunitaria ad un ceppo vaccinale omologo sia più omogenea rispetto a quella stimolata da una combinazione di vaccini basati su diversi ceppi, facilitando la selezione di mutazioni specifiche e quindi l'emergenza di varianti resistenti.

In un contesto come quello avicolo, in cui l'immunità indotta dalla vaccinazione è con tutta probabilità il principale fattore a stimolare e dirigere l'evoluzione virale, si tratta di un'informazione di cruciale importanza per una consapevole pianificazione dei protocolli vaccinali.

Per mitigare l'effetto della vaccinazione omologa sull'evoluzione virale, si potrebbero predisporre dei controlli epidemiologici cadenzati volti a identificare i ceppi di campo circolanti e, nel caso dell'emergenza di nuove varianti resistenti, sarebbe possibile valutare l'utilizzo della vaccinazione eterologa.

Saranno necessari ulteriori studi sperimentali e di campo per confermare la fondatezza delle ipotesi sinora esposte ed in particolare per valutare l'efficacia della vaccinazione eterologa rispetto a quella omologa nell'arginare l'emergenza di nuove varianti virali.

L'applicazione e l'ottimizzazione delle strategie di controllo attualmente disponibili, affiancate ad un monitoraggio epidemiologico costante, rimangono in ogni caso essenziali per ridurre la circolazione ed il potenziale evolutivo di IBV.

## 8 BIBLIOGRAFIA

---

- Abascal, F., Zardoya, R., & Telford, M. J. (2010). TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue), W7-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq291>
- Abdel-Moneim, A. S., El-Kady, M. F., Ladman, B. S., & Gelb, J. (2006). S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology Journal*, 3(1), 78. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-78>
- Anisimova, M., & Kosiol, C. (2007). Investigating Protein-Coding Sequence Evolution with Probabilistic Codon Substitution Models. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn232>
- Bande, F., Arshad, S. S., Omar, A. R., Bejo, M. H., Abubakar, M. S., & Abba, Y. (2016). Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. *Advances in Virology*, Vol. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4621659>
- Bande, F., Arshad, S. S., Rahman Omar, A., Hair-Bejo, M., Mahmuda, A., & Nair, V. (2017). Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000044>
- Benyeda, Z., Mató, T., Süveges, T., Szabó, É., Kardi, V., Abonyi-Tóth, Z., ... Palya, V. (2009). Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathology*, 38(6), 449–456. <https://doi.org/10.1080/03079450903349196>
- Bijlenga, G., Cook, J. K. A., Gelb, Jr, J., & Wit, J. J. de. (2004). Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathology*, 33(6), 550–557. <https://doi.org/10.1080/03079450400013154>
- Bochkov, Y. A., Batchenko, G. V., Shcherbakova, L. O., Borisov, A. V., & Drygin, V. V. (2006). Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathology*, 35(5), 379–393. <https://doi.org/10.1080/03079450600921008>

- Boltz, D. A., Nakai, M., & Bahr, J. M. (2004). Avian Infectious Bronchitis Virus: A Possible Cause of Reduced Fertility in the Rooster. *Avian Diseases*, 48(4), 909–915. <https://doi.org/10.1637/7192-040808R1>
- Box, P. G., Beresford, A. V, & Roberts, B. (1980). Protection of laying hens against infectious bronchitis with inactivated emulsion vaccines. *The Veterinary Record*, 106(12), 264–268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6246669>
- Bozorgmehri-Fard, M. H., Charkhkar, S., & Hosseini, H. (2013). Detection of the Chinese Genotype of Infectious Bronchitis Virus (QX-type) in Iran. *Iranian Journal of Virology*, 7(1), 57–60. <https://doi.org/10.21859/isv.7.1.2.57>
- Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., & Britton, P. (2003). Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *Journal of Virology*.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., & Naylor, C. J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28(6), 593–605. <https://doi.org/10.1080/03079459994399>
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, 34(6), 439–448. <https://doi.org/10.1080/03079450500367682>
- Cavanagh, D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research*, 38(2), 281–297. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006055>
- Cook, G. (2000). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (4th edn) by C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport and J.D. Capra. *Immunology Today*, 21(4), 201. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01613-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01613-3)
- Cook, J. K. A., Darbyshire, J. H., & Peters, R. W. (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Archives of Virology*, 50(1–2), 109–118. <https://doi.org/10.1007/BF01318005>
- Cook, J. K. A., Jackwood, M., & Jones, R. C. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology*, 41(3), 239–250. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.680432>
- Cook, J. K. A., Orbell, S. J., Woods, M. A., & Huggins, M. B. (1999). 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 Pathology*, 28(5), 477–485. <https://doi.org/10.1080/03079459994506>
- Cumming, R. B. (2008). Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 39(4), 145–147. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1963.tb04255.x>
- De Wit J.J. & Britton P. (2018). Chapter 2.3.2. Avian Infectious Bronchitis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018*. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- De Wit, J. J. (2000). Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 29(2), 71–93. <https://doi.org/10.1080/03079450094108>
- Delport, W., Scheffler, K., & Seoighe, C. (2008). Models of coding sequence evolution. 10(1). <https://doi.org/10.1093/bib/bbn049>
- Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C. M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., ... Moreno, A. (2017). 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(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184401>
- Franzo, G., Naylor, C. J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., ... Cecchinato, M. (2014). Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine*, 32(50), 6765–6767. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2014.10.006>
- Franzo, G., Tucciarone, C. M., Blanco, A., Nofrarías, M., Biarnés, M., Cortey, M., ... Cecchinato, M. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine*, 34(46), 5670–5676. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.014>
- Gillespie JH. 1991. *The Causes of Molecular Evolution*. New York: Oxford Univ. Press. 336 pp.
- Hopkins, S. R., & Yoder, H. W. (1984). Increased Incidence of Airsacculitis in Broilers Infected with *Mycoplasma synoviae* and Chicken-Passaged Infectious

- Bronchitis Vaccine Virus. *Avian Diseases*, 28(2), 386.  
<https://doi.org/10.2307/1590345>
- Hopkins, S. R., & Yoder, H. W. (1986). Reversion to Virulence of Chicken-Passaged Infectious Bronchitis Vaccine Virus. *Avian Diseases*, 30(1), 221.  
<https://doi.org/10.2307/1590639>
- Jackwood, M. W. (2012). Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Diseases*, 56(4), 634–641. <https://doi.org/10.1637/10227-043012-Review.1>
- Jackwood, M. W., & de Wit, S. (2017). Infectious Bronchitis. In *Diseases of Poultry: Thirteenth Edition* (pp. 139–159). <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch4>
- Jones, R. C., & Jordan, F. T. (1971). The site of replication of infectious bronchitis virus in the oviduct of experimentally infected hens. *The Veterinary Record*, 89(11), 317–318. <https://doi.org/10.1136/VR.89.11.317>
- Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D. J., Kusters, J. G., Poelwijk, F. A. J., & van der Zeijst, B. A. M. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *Journal of General Virology*, 73(3), 591–596.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-3-591>
- Kennedy, D. A., & Read, A. F. (2017). Why does drug resistance readily evolve but vaccine resistance does not? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1851), 20162562. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2562>
- Kimura, M. (1968). Evolutionary Rate at the Molecular Level by Motoo Kimura. In *nature* (Vol. 217).
- Kosakovsky Pond, S. L., & Frost, S. D. W. (2005). Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1208–1222.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msi105>
- Liu, S., & Kong, X. (2004). A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathology*, 33(3), 321–327. <https://doi.org/10.1080/0307945042000220697>
- Matthijs, M. G. R., van Eck, J. H. H., de Wit, J. J., Bouma, A., & Stegeman, J. A. (2005). Effect of IBV-H120 Vaccination in Broilers on Colibacillosis

- Susceptibility After Infection with a Virulent Massachusetts-Type IBV Strain. *Avian Diseases*, 49(4), 540–545. <https://doi.org/10.1637/7380-051305R.1>
- Murrell, B., de Oliveira, T., Seebregts, C., Kosakovsky Pond, S. L., & Scheffler, K. (2012). Modeling HIV-1 drug resistance as episodic directional selection. *PLoS Computational Biology*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002507>
- Murrell, B., Moola, S., Mabona, A., Weighill, T., Sheward, D., Kosakovsky Pond, S. L., & Scheffler, K. (2013). FUBAR: A fast, unconstrained bayesian AppRoximation for inferring selection. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1196–1205. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst030>
- Murrell, B., Wertheim, J. O., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K., & Kosakovsky Pond, S. L. (2012). Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genetics*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002764>
- Nielsen, Rasmus, Pond, S. L. K., & Muse, S. V. (2005). HyPhy: Hypothesis Testing Using Phylogenies Statistical Methods in Molecular Evolution. In R Nielsen (Ed.), *Statistical methods in molecular evolution* (pp. 125–181). [https://doi.org/10.1007/0-387-27733-1\\_6](https://doi.org/10.1007/0-387-27733-1_6)
- Nielsen, Rasmus. (2005). Molecular Signatures of Natural Selection. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 197–218. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.112420>
- Ovchinnikova, E. V., Bochkov, Y. A., Shcherbakova, L. O., Nikonova, Z. B., Zinyakov, N. G., Elatkin, N. P., ... Drygin, V. V. (2011). Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates from Russia and neighbouring countries: identification of intertypic recombination in the S1 gene. *Avian Pathology*, 40(5), 507–514. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.605782>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pond, S. L. K., Murrell, B., & Poon, A. F. Y. (2012). Evolution of Viral Genomes: Interplay Between Selection, Recombination, and Other Forces. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-585-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-585-5_10)

- Schultze, B., Cavanagh, D., & Herrler, G. (1992). Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. *Virology*, 189(2), 792–794. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90608-R](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90608-R)
- Seger, W., GhalyanchiLangeroudi, A., Karimi, V., Madadgar, O., Marandi, M. V., & Hashemzadeh, M. (2016). Genotyping of infectious bronchitis viruses from broiler farms in Iraq during 2014-2015. *Archives of Virology*, 161(5), 1229–1237. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2790-2>
- Shang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Liu, C., Geng, Q., Luo, C., ... Li, F. (2018). Cryo-EM structure of infectious bronchitis coronavirus spike protein reveals structural and functional evolution of coronavirus spike proteins. *PLOS Pathogens*, 14(4), e1007009. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007009>
- Snijder, E. J., & Siddell, S. (2008). An Introduction to Nidoviruses. In *Nidoviruses* (pp. 1–13). <https://doi.org/10.1128/9781555815790.ch1>
- Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., ... Capua, I. (2008). 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 Pathology*, 37(5), 487–493. <https://doi.org/10.1080/03079450802356938>
- Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349–364. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2016.02.015>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S. J., Liu, W., & Kwang, J. (2001). Characterization of Three Infectious Bronchitis Virus Isolates from China Associated with Proventriculus in Vaccinated Chickens. *Avian Diseases*, 45(2), 416. <https://doi.org/10.2307/1592981>

- YuDong, W., YongLin, W., ZiChun, Z., GenChe, F., YiHai, J., XiangE, L., ... ShuShuang, W. (1998). Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 15(1), 1–3.
- Zou, N., Xia, J., Wang, F., Duan, Z., Miao, D., Yan, Q., ... Huang, Y. (2015). Two novel neutralizing antigenic epitopes of the s1 subunit protein of a QX-like avian infectious bronchitis virus strain Sczy3 as revealed using a phage display peptide library. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 168(1–2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2015.08.008>



## 9 SITOGRAFIA

---

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

<http://www.fao.org/faostat>

<http://www.geospiza.com>

<http://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/9673>

<http://www.partnersah.vet.cornell.edu/avian-atlas/search/disease/497>

<http://www.talk.ictvon-line.org/media/p/1230.aspx>

<http://www.technelysium.com.au/wp/chromaspro/>

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

<https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/27118>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>



# Ringraziamenti

*Desidero ringraziare il Professor Cecchinato, relatore di questa tesi, per avermi dato la possibilità di partecipare ad un progetto innovativo ed appassionante, piantando il seme di quella che potrebbe essere la mia futura vita professionale.*

*Ringrazio i correlatori, il dottor Franzo, per le spiegazioni sempre chiarissime anche degli argomenti più ostici, e il dottor Legnardi, per l'estrema disponibilità, la pazienza, i consigli, la gentilezza e l'enorme sostegno rivoltomi durante le fasi sperimentali e la stesura di questo elaborato.*

*Ringrazio inoltre i professori, i ricercatori e il personale del laboratorio di Malattie Infettive per avermi ospitata e fatta sentire nel posto giusto.*

*Un grazie sincero a mia madre e a mio padre, che con i loro sacrifici mi hanno permesso di inseguire i miei obiettivi, di crescere, di fare esperienze: grazie per avermi donato con affetto tutto il meglio che potevate e oltre.*

*Grazie a mio fratello e alle mie sorelle per avermi sempre aiutato e supportato in questo difficile percorso.*

*Grazie a chi ha trascorso questi anni universitari con me condividendo fatiche, gioie e momenti, ad ognuno di voi devo molto.*