

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

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

**EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI CEPPI
DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE
GENOTIPO QX CIRCOLANTI IN ITALIA**

Relatore
Dott. Mattia Cecchinato

Correlatore
Dott. Giovanni Franzo

Laureanda
Sara Rizzo
Matricola n. 562727/MV

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5

PARTE INTRODUTTIVA

CAPITOLO 1 – Eziologia	7
1.1 TASSONOMIA	7
1.2 MORFOLOGIA E ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA	7
1.3 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE	10
1.4 SIEROTIPO E GENOTIPO	10
1.5 REPLICAZIONE DEL VIRUS	13
CAPITOLO 2 – Epidemiologia	15
2.1 SPECIE SENSIBILI.....	15
2.2 MODALITÀ DI TRASMISSIONE.....	15
2.3 STORIA DELLA MALATTIA	16
2.4 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA	17
CAPITOLO 3 – Patogenesi	21
CAPITOLO 4 – Sintomatologia e Lesioni Anatomo-Istopatologiche	27
4.1 APPARATO RESPIRATORIO.....	27
4.2 APPARATO URINARIO	28
4.3 APPARATO RIPRODUTTORE.....	29
4.4 APPARATO DIGERENTE	32
4.5 ALTRI ORGANI E TESSUTI.....	32
CAPITOLO 5 – Diagnosi	35
CAPITOLO 6 – Controllo della Malattia	41
6.1 RISPOSTA IMMUNITARIA	41

6.2	PREVENZIONE DELLA MALATTIA	42
6.3	CONTROLLO DELLA MALATTIA.....	42
6.4	VACCINI ATTUALMENTE IN USO	44
6.5	VACCINO CONTRO IL GENOTIPO QX	45

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 7 – Materiali e Metodi.....	47
7.1 CAMPIONI.....	47
7.2 DATABASE	48
7.3 SEQUENZIAMENTO REGIONE IPERVARIABILE DELLA PROTEINA S1	48
7.4 DISEGNO DEI <i>PRIMER</i> PER L'AMPLIFICAZIONE E IL SEQUENZIAMENTO DELL'INTERA REGIONE S1.....	49
7.5 PROTOCOLLO PCR E VALIDAZIONE	50
7.6 ELETTROFORESI.....	51
7.7 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR E SEQUENZIAMENTO	52
7.8 ANALISI DELLE SEQUENZE	52
7.9 ANALISI BIOINFORMATICHE	52
CAPITOLO 8 – Risultati e Discussione	55
8.1 VALIDAZIONE PROTOCOLLO	55
8.2 ANALISI DELLE SEQUENZE	56
8.2.1 Classificazione delle sequenze in esame.....	56
8.2.1.1 <i>Analisi dei ceppi ricombinanti</i>	56
8.2.1.2 <i>Differenze genomiche tra vaccino QX, progenitore del vaccino e ceppi italiani</i>	59
8.2.2 Variabilità nucleotidica dei ceppi di IBV.....	64
8.2.3 Entropia delle sequenze dei ceppi di IBV	65
8.2.4 Pressione Selettiva.....	65
8.2.5 Distribuzione geografica dei ceppi QX e analisi filogenetica	68
8.2.6 Analisi dell'età sintomatologica dei campioni studiati	71
CONCLUSIONI	73
BIBLIOGRAFIA E SITI INTERNET CONSULTATI	75
RINGRAZIAMENTI	85

RIASSUNTO

La Bronchite Infettiva aviare (IBV) è una malattia virale diffusa in tutto il mondo che causa alta morbilità e mortalità variabile, infettando soprattutto il pollo. Si presenta come un'infezione del tratto respiratorio superiore e nei riproduttori si diffonde anche all'apparato genitale causando gravi danni all'industria avicola.

Come tutti i virus a RNA, IBV presenta un alto grado di diversità genetica che dà vita a differenti genotipi virali con caratteristiche differenti.

In particolare nella presente tesi sono stati analizzati 73 campioni appartenenti al virus della Bronchite Infettiva aviare genotipo QX, prelevati da Gennaio 2012 a Giugno 2014, da 60 allevamenti di broiler dislocati in Nord Italia e da 2 aziende di Benevento.

Per l'amplificazione e il successivo sequenziamento dei campioni è stato messo a punto e validato un protocollo di RT-PCR in grado di amplificare la proteina S1. I campioni sono stati sottoposti a tale protocollo e i prodotti di PCR sono stati visualizzati dopo corsa elettroforetica, purificati e sequenziati. Sono state ottenute 69 sequenze parziali e 17 sequenze complete della proteina S1.

L'analisi filogenetica ha evidenziato che i campioni italiani studiati formano un *clade* distinto, sebbene eterogeneo, e sono filogeneticamente distanti da campioni derivanti da altri Stati.

Dalle analisi bioinformatiche delle sequenze della regione ipervariabile del gene S1 è stata eseguita un'analisi filogeografica che ha messo in evidenza un nucleo centrale di diffusione del genotipo analizzato, localizzato nei pressi di Verona, e che tutte le sequenze "periferiche" derivano da questo nucleo. Risulta interessante il caso dei due campioni di Benevento, i quali derivano indipendentemente dal nucleo veronese e non sono in relazione tra loro, diversamente da come ci si aspetterebbe.

Confrontando le sequenze dei nostri campioni con quelle dell'unico vaccino genotipo QX disponibile in commercio e del suo progenitore è stato possibile identificare dei *marker* genomici in grado di distinguere in maniera inequivocabile i ceppi genotipo QX italiani dal vaccino omologo. Tali *marker* saranno utili quando verrà introdotta in Italia la vaccinazione con il vaccino QX per svolgere indagini epidemiologiche corrette.

Sono stati inoltre identificati due eventi di ricombinazione, aventi come stipiti parentali virus appartenenti ai genotipi QX e 793B. Uno di questi ceppi ricombinanti si è dimostrato essere uguale ad altri campioni identificati da un gruppo di ricerca dell'Istituto Zooprofilattico

Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna e campionati in allevamenti limitrofi a quelli dove è stato svolto questo lavoro.

Per ultimo è stata confrontata l'età d'insorgenza della sintomatologia degli animali positivi al genotipo QX, sottoposti a regolare vaccinazione con un piano vaccinale che prevedeva il vaccino H120 in incubatoio e il richiamo con 793B a 14 giorni di vita, con quella degli animali non sottoposti a richiamo. È stato evidenziato che l'età media d'insorgenza della sintomatologia degli animali vaccinati solo con il vaccino H120 diminuisce. Questo potrebbe essere imputabile ad una non completa protezione e potrebbe comportare danni maggiori per l'industria avicola poiché vengono colpiti animali più giovani con maggiore sensibilità al patogeno.

ABSTRACT

Infectious Bronchitis is a worldwide viral disease of poultry caused by Infectious Bronchitis Virus (IBV), with high morbidity and variable mortality. It is an infection of the upper respiratory tract and in reproductive animals it diffuses also in the genital apparatus, causes important damages in avian industry.

IBV, as all RNA viruses, has a great genetic diversity that creates different viral genotypes with unlike features.

In the present study we have analyzed 73 samples of avian Infectious Bronchitis Virus genotype QX isolated from 60 broiler's farms in Northern Italy and from 2 farms in Benevento in the period between January 2012 and June 2014.

A protocol for RT-PCR has been developed and validated for the amplification and sequencing of the S1 protein. Sixty-nine partial and 17 complete S1 sequences were obtained.

Phylogenetic analysis has evidenced that the Italian samples, even if heterogeneous, are part of a different and distinct *clade* and are phylogenetical distant from samples originated from other Countries.

In addition, a phylogeographic bioinformatics analysis was carried out on the sequences of the hypervariable S1 region which strongly suggested that there is a central nucleus of diffusion, near Verona, and that all the other "peripheral" sequences originate from this nucleus. It is very interesting that the two samples from Benevento come from the nucleus located near Verona independently and they are not in relation each other, differently from what was initially supposed.

During the comparison between our sequences with both the only commercialized vaccine genotyping QX and its progenitor, we have identified some genetic markers that can be used for a secure differentiation from Italian strains genotype QX and the homologous vaccine.

That markers will be useful, when the vaccination with homologous vaccine QX will be introduced in Italy, for accurate epidemiological survey.

In this work we have also identified two recombination events, that derivate from parental viruses classified into genotype QX and 793B. One of that is identical to other strains identified by another research group of *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna* and sampled in neighboring farms to the farm where our recombinant where sampled.

We have also compared the age of the birds when IBV genotype QX was identified in animals regularly vaccinated with the vaccine scheme used until Spring 2013 (that includes vaccine H120 in hatchery and vaccine 793B for the booster vaccination) with the age of non-boostered animals. In these last animals the clinical signs were more precocious. It could cause important damages for the avian industry because young animals with major sensitivity to pathogen display an higher disease risk.

INTRODUZIONE

La Bronchite Infettiva aviare (IBV) è una malattia virale diffusa in tutto il mondo, secondaria solamente all'Influenza aviare come impatto economico per l'industria avicola.

Presenta alta morbilità, con capacità di diffondere rapidamente tra capannoni e allevamenti diversi, e mortalità variabile.

Si presenta come un'infezione del tratto respiratorio superiore, che può essere aggravata da infezioni batteriche secondarie; nei riproduttori si diffonde anche all'apparato genitale, causando una drastica riduzione della produzione e della qualità delle uova. La specie più colpita è il pollo anche se il virus è stato ritrovato in altre specie avicole, come il fagiano.

IBV è stata osservata per la prima volta negli Stati Uniti negli anni '30 e da qui si è diffusa in quasi tutti i paesi del mondo, Italia compresa.

Il virus della Bronchite Infettiva, come tutti i virus a RNA, presenta un alto grado di diversità genetica, che deriva da un'alta frequenza di mutazioni e ricombinazioni tipiche del virus che danno vita a differenti genotipi virali che hanno caratteristiche patogenetiche, biologiche e distribuzione geografica differenti.

Nella presente tesi ci si è voluti soffermare sul genotipo QX, scoperto per la prima volta in Cina nel 1996, associato a casi di proventriculite e al fenomeno delle false ovaiole, che si è poi diffuso in molti altri paesi limitrofi ed in altri paesi di continenti diversi, compresa l'Italia, diventando il genotipo più diffuso a livello europeo.

Per valutare l'evoluzione genetica e filogeografica di campioni di campo genotipo QX identificati dal 2012 al 2014 in Italia, verrà messo a punto un protocollo di sequenziamento della regione ipervariabile della proteina S1, il tratto di genoma virale più soggetto a variazioni e per questo comunemente utilizzato per differenziare i diversi genotipi di IBV circolanti. Inoltre su alcuni campioni selezionati verrà sequenziato l'intero gene S1.

Le sequenze ottenute verranno confrontate con una selezione di ceppi di IBV genotipo QX identificati in altri paesi europei.

Attualmente per il controllo della malattia causata dal virus della Bronchite Infettiva genotipo QX viene utilizzato un protocollo vaccinale basato su due vaccini eterologhi (H120 in incubatoio e 793B in allevamento dopo la seconda settimana di vita), ma in futuro si prevede l'utilizzo di un vaccino omologo da poco registrato in Italia. Data la disponibilità di sequenze di ceppi sicuramente di campo identificati prima dell'utilizzo di tale vaccino, della sequenza del vaccino e del suo progenitore, verrà effettuata una comparazione volta ad identificare, se presenti, dei *marker* vaccinali. La possibilità di discriminare in maniera

inequivocabile i ceppi di campo da quelli di origine vaccinale permetterà in futuro di svolgere indagini epidemiologiche corrette.

La presenza di vari fenomeni di ricombinazione avvenuti tra ceppi di IBV diversi è nota e riportata in bibliografia. Durante il presente lavoro verrà posta particolare attenzione alla identificazione di possibili eventi di ricombinazione presenti nei campioni analizzati e gli eventuali ceppi ricombinanti verranno analizzati per valutarne l'origine e diffusione nel territorio.

1. EZIOLOGIA

1.1 TASSONOMIA

Il virus della Bronchite Infettiva (IBV) è un *Gammacoronavirus*, appartenente alla famiglia *Coronaviridae*, ordine *Nidovirales*.

La recente scoperta di una grande varietà di nuovi coronavirus in diverse specie d'ospite ha spinto il *Coronavirus Study Group dell'International Committee for Taxonomy of Viruses* (ICTV) a proporre la riclassificazione della famiglia *Coronaviridae* in due sottofamiglie: *Coronavirinae* e *Torovirinae*.

In particolare, la sottofamiglia *Coronavirinae* comprende ora quattro generi: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*, che hanno sostituito i tre tradizionali gruppi antigenici (gruppo I, gruppo II, gruppo III).

Al genere *Alfacoronavirus* e *Betacoronavirus* (vecchi gruppi I e II) appartengono tutti i virus dei mammiferi (compresi quelli dei pipistrelli e il virus della SARS); mentre i *Gammacoronavirus* (vecchio gruppo III) comprendono tutti i virus aviari, ad esempio IBV e TCoV (*Turkey Coronavirus*). L'unica eccezione d'ospite è rappresentata dal ceppo *Beluga whale Cov SW1*, identificato in un mammifero acquatico.

La sottofamiglia *Deltacoronavirus* comprende invece virus aventi come ospiti sia mammiferi che uccelli.

Come tutti i coronavirus, IBV presenta un alto tasso di mutazione che, insieme con l'elevata frequenza di ricombinazione, ne favoriscono l'adattamento a nuovi ospiti e nicchie ecologiche.

1.2 MORFOLOGIA E ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA

Il virus della Bronchite Infettiva è un virus provvisto di *envelope*, di forma rotonda o pleomorfa; ha un diametro di circa 120 nm con delle proiezioni sulla superficie di circa 20 nm di lunghezza chiamate *spikes* che danno al virus l'aspetto di una corona solare (da qui il nome *coronavirus*) (Fig. 1 e Fig. 2).

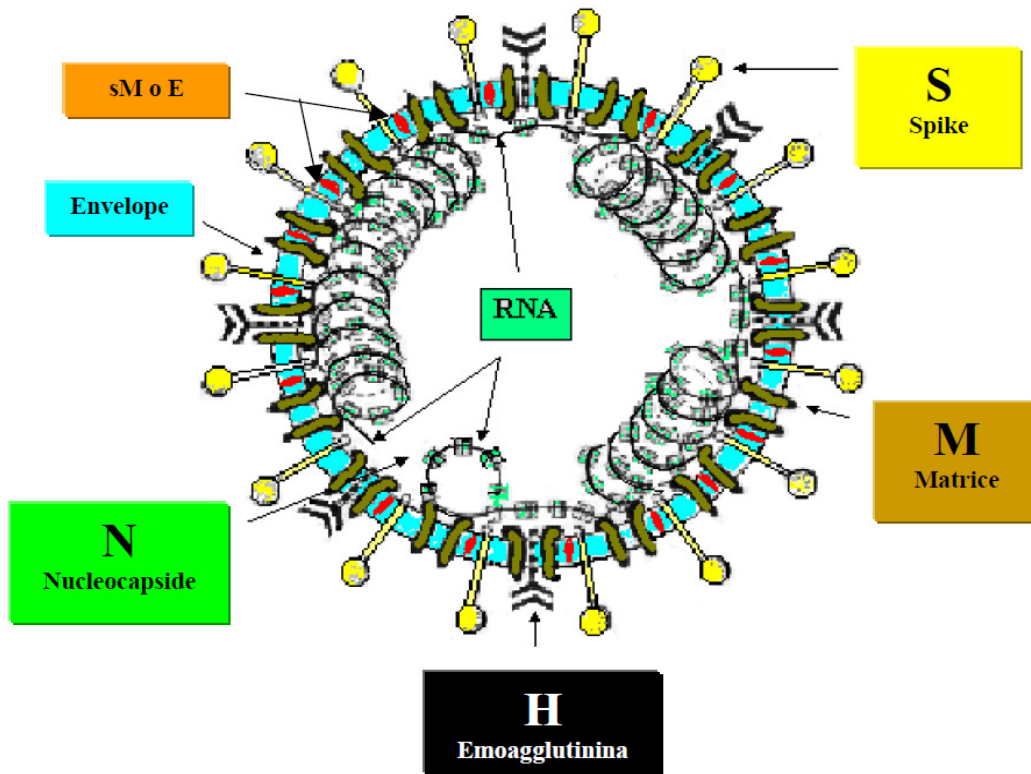


Figura 1 Rappresentazione schematica di un coronavirus (Pascucci, 1998)

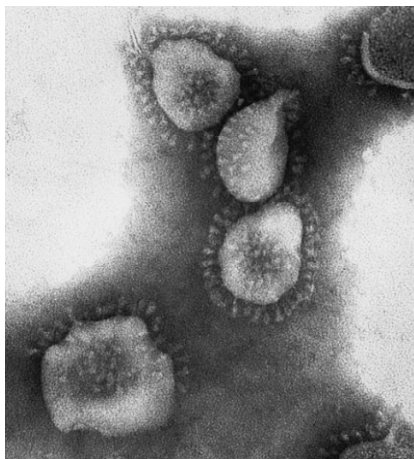


Figura 2
Virus della Bronchite Infettiva visto al
microscopio elettronico, 3,300,000X (Jackwood e
De Wit, 2013)

Il genoma dei *coronavirus* è il più grande genoma non-segmentato tra i virus a RNA attualmente conosciuti; in particolare il genoma del virus della Bronchite Infettiva è costituito da un singolo filamento di RNA lineare approssimativamente di 27.5-28 Kbp di lunghezza, a polarità positiva (ssRNA+) che, combinandosi con il capsido, forma un nucleocapside a simmetria elicoidale (Jackwood e De Wit, 2013). Il genoma è suddivisibile in *open reading frame* (ORF) che hanno il compito di codificare un complesso di proteine strutturali (per esempio S, E, M, N) e non-strutturali (per esempio NSPs 2-16, 3a, 3b, 5a, 5b), organizzate

nel genoma in un preciso ordine (per esempio 5'UTR-nsps₍₂₋₁₆₎-S-3a, b, c(E)-M-5a, b-N-3'UTR). Più di due terzi del genoma virale sono occupati da due ORF sovrapposte (ORF1a e ORF1b). La porzione più a valle del gene (ORF1b) è espressa solamente grazie a un *frameshift* ribosomiale -1. Le poliproteine codificate da queste ORF sono successivamente clivate proteoliticamente dando origine a diverse proteine non strutturali (NSPs 2-16).

Le proteine a valle di questa regione sono invece espresse a seguito della trascrizione di mRNA subgenomici aventi l'estremità 3' in comune. Tuttavia, sebbene questi mRNA siano strutturalmente policistronici, la traduzione è limitata al primo gene in posizione 5'.

Mediante questo processo vengono espresse le proteine non strutturali, la glicoproteina spike (S), le proteine strutturali del nucleocapside (N), la glicoproteina di membrana (M), che attraversa il doppio strato lipidico più volte ripiegandosi su se stessa, e la proteina dell'*envelope* (E) (Ponti, 2005) (Fig. 3).

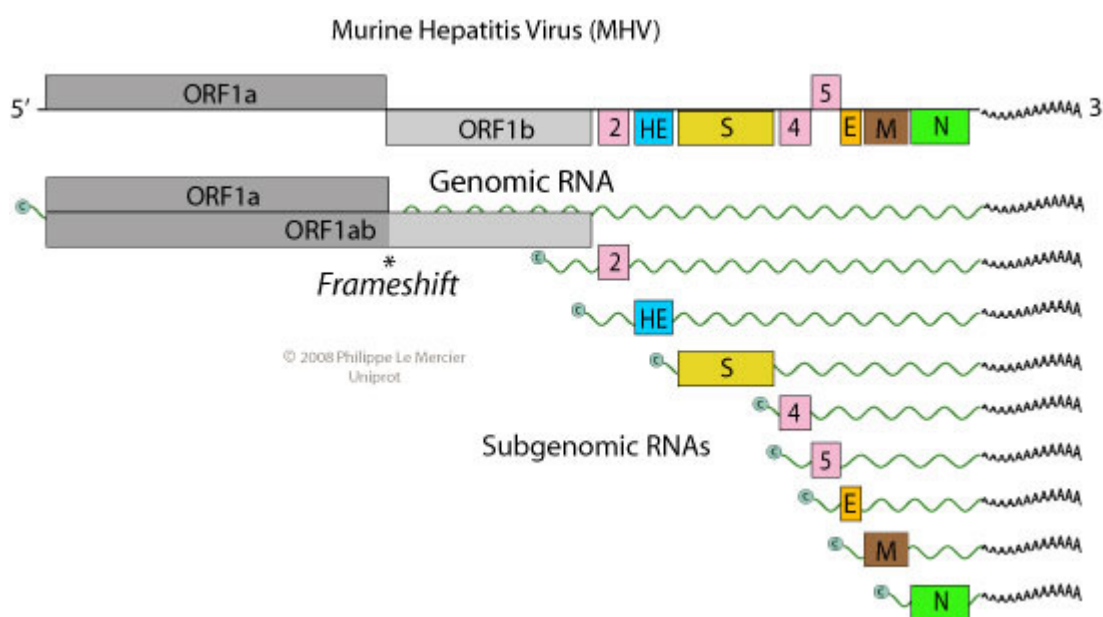


Figura 3 Rappresentazione schematica della struttura del genoma di un coronavirus (ViralZone)

La glicoproteina S è costituita da una serie ordinata di due subunità: l'estremità N-terminale (S1 di 520 amminoacidi) che svolge una funzione di legame al recettore cellulare e l'estremità C-terminale (S2 di 625 amminoacidi) che permette la fusione con la membrana e il rilascio del virus nel citoplasma.

Come prevedibile, in funzione del suo ruolo biologico e della posizione nella struttura virale, questa proteina rappresenta anche il principale target della risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata. Rappresenta infatti il principale epitopo immunostimolante e neutralizzante.

Durante la replicazione spesso viene prodotta in eccesso e veicolata sulla membrana plasmatica, rendendo la cellula infetta sensibile alla citotossicità cellulo-mediata. La necessità di eludere l'immunità di popolazione giustifica l'estrema variabilità della proteina S.

La glicoproteina M viene esposta sulla superficie del virus, va a indurre la produzione di anticorpi che partecipano alla immunità umorale e induce la produzione di interferoni (IFN).

La proteina E è una piccola proteina integrale di membrana che partecipa, con la proteina M, all'assemblaggio dei virioni.

La proteina N va a formare il nucleocapside ad elica, è capace di indurre immunità cellulo-mediata ed interagisce con le altre per l'assemblaggio, modulando la sintesi di RNA (Ponti, 2005).

1.3 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE

Il virus è sensibile al calore, infatti viene inattivato se esposto a 56 °C per 15 minuti, anche se in alcuni esperimenti sono stati necessari 30 minuti a 60 °C.

Può sopravvivere per 12 giorni a temperatura ambiente, ma per i campioni diagnostici l'ideale è mantenere la catena del freddo; infatti IBV sopravvive per alcuni mesi a 4°C. Tuttavia, per una conservazione a lungo termine, l'ideale è mantenere il campione\virus ad una temperatura di -80°C; il fluido allantoideo liofilizzato e mantenuto in refrigeratore può resistere per 30 anni (Jackwood e De Wit, 2013).

I vaccini attenuati vengono liofilizzati con saccarosio o lattosio per preservarne la stabilità ed aumentarne l'emivita.

Il pH acido (attorno al 3) inattiva il virus; pH quasi neutro (tra 6 e 6.5) rappresenta l'ambiente ideale anche se ci sono molte differenze tra i vari stipiti virali. In quanto dotato di *envelope*, IBV è sensibile a sostanze acide lipidiche, come il cloroformio al 50%, e ai comuni disinfettanti. Solo il beta-proprilattone non ha effetti negativi sull'emoagglutinazione (HA) rendendo il virus adatto alla creazione di antigeni HA e vaccini spenti.

1.4 SIEROTIPO E GENOTIPO

Per classificare il virus della Bronchite Infettiva sono stati proposti vari metodi. I più comuni prendono in considerazione il sierotipo, il protettotipo e, negli ultimi tempi, il genotipo.

Per sierotipo si intende la struttura antigenica del virus, per genotipo le informazioni contenute all'interno del genoma o parte di esso (Ponti, 2005).

La classificazione per definire il sierotipo utilizza anticorpi specifici, mentre quella per il genotipo è comunemente basata sulla sequenza della regione S1 del genoma virale. Secondo Jackwood e De Wit (2013) ceppi di IBV che hanno almeno il 90% di amminoacidi simili nel gene S1 sono sierotipicamente correlati.

- *Classificazione in sierotipi*: tradizionalmente i sierotipi sono stati identificati per mezzo di due test di neutralizzazione su uova embrionale di pollo; per prima cosa si faceva reagire il virus sconosciuto con antisieri di ceppi noti, in seguito veniva preparato l'anticorpo contro il ceppo virale sconosciuto e fatto reagire contro i ceppi noti. Un'altra classificazione usa il test dell'Inibizione dell'Emoagglutinazione (HI). Non tutti i ceppi di IBV però emoagglutinano spontaneamente e quindi devono essere trattati con neuroaminidasi perché agglutinino globuli rossi di pollo.

- *Classificazione in genotipi*: per la classificazione si utilizza la tecnica della *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) al fine di amplificare il gene S o la regione ipervariabile S1 (che si trova in posizione 20342-21952 nucleotidi, JQ088078 Ceppo QX-like europeo) o parte di essa, che viene successivamente sequenziata. Sono state stabilite le sequenze di molti virus campionati da tutto il mondo e queste sono disponibili in *Genbank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Comparando le sequenze di S1 con il programma elettronico *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), si può creare l'analisi filogenetica dei vari ceppi virali. È stato osservato che molti sierotipi simili presentano una distanza genetica circa del 10% e che quindi solo poche variazioni creano differenze conformazionali negli epitopi neutralizzanti della proteina S1 (Sukupolvi-Petty *et al.*, 2013). Ciononostante si può rilevare una correlazione negativa fra la distanza genica e la cross-protezione (Cavanagh *et al.*, 1997).

Sono conosciuti vari tipi, sottotipi e varianti di IBV, generati dall'alto grado di diversità genetica che deriva dall'alta frequenza di mutazioni e ricombinazioni tipiche del virus: le mutazioni includono sostituzioni, inserzioni o delezioni causate da errori della RNA polimerasi. I genotipi e i sierotipi vengono nominati in maniera differente in base al luogo dove vengono isolati, con l'iniziale dello Stato oppure con l'anno del rilevamento.

L'utilizzo su vasta scala della genotipizzazione, più facile, rapida ed economica rispetto alla sierotipizzazione, ha permesso un più approfondito studio dei genotipi circolanti e della loro distribuzione a livello mondiale (Jackwood, 2013).

Con la tecnica del sequenziamento è possibile valutare se un dato genotipo virale rimane isolato in un certo territorio, si diffonde in paesi vicini o anche in paesi molto distanti.

Negli ultimi 40 anni sono stati scoperti molti genotipi e ceppi diversi, ma pochi si sono mantenuti nel tempo; per esempio il tipo Arkansas continua a essere un problema negli Stati

Uniti e la sua variante California, scoperta nel 1991, è ancora presente negli allevamenti americani. Altri genotipi considerati scomparsi hanno fatto ritorno, per esempio il genotipo Delaware in USA. Questi 3 virus però non sono mai usciti dal territorio americano.

Al contrario il genotipo 793B (o 4/91), apparso per la prima volta in Gran Bretagna e in Francia all'inizio degli anni '90, è stato poi trovato in varie parti del mondo, tra cui l'Italia, ma escludendo gli USA.

Nel capitolo 2 verranno descritti i principali genotipi circolanti e la loro distribuzione nei vari continenti, con particolare riguardo alla situazione epidemiologica europea e italiana.

In associazione alla classificazione dei virus della Bronchite Infettiva in sierotipo e genotipo, esiste anche, per ragioni pratiche, un raggruppamento dei virus in protettotipo.

Per protettotipo si intende un gruppo di virus che in prove di cross-protezione *in vivo* determina fra loro una protezione crociata.

Tale classificazione è molto importante perché dà informazioni dirette e pratiche sull'efficacia dei vaccini. Infatti un ceppo vaccinale induce protezione anche nei confronti di tutti gli altri ceppi che appartengono allo stesso protettotipo (De Wit *et al.*, 2011).

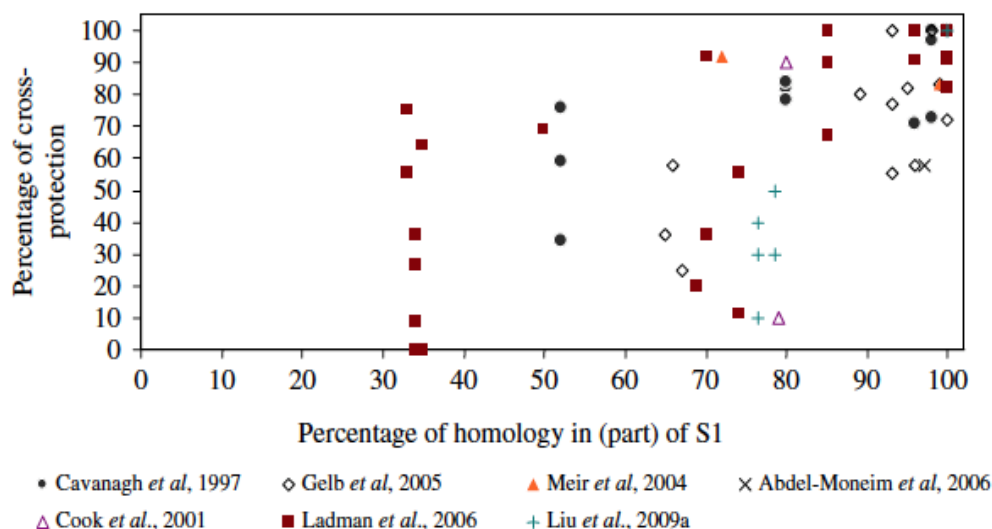


Figura 4 Correlazione tra il livello di omologia tra la regione S1 del gene S di ceppi di IBV e il livello di cross-protezione in alcuni ceppi riportati in bibliografia (De Wit *et al.*, 2011)

Molti autori affermano che più è alta la percentuale di omologia della regione S1 del genoma virale tra il ceppo vaccinale utilizzato e il ceppo virale di campo circolante, più sarà efficace il vaccino contro quel ceppo.

La Fig. 4 conferma questa ipotesi e, inoltre, dimostra l'esistenza di ceppi che differiscono poco dal ceppo vaccinale ma che presentano una cross-protezione molto bassa; questo fa

supporre che la cross-protezione non dipenda solamente dalla omologia della regione S1, ma che ci siano altre regioni importanti.

Negli anni si sono accumulate differenze nella nomenclatura dei ceppi virali, ma recentemente si sta iniziando ad adottare il sistema suggerito da Cavanagh nel 2001, simile a quello usato per l'Influenza aviare: lo schema è costituito da IBV / specie aviare / paese di origine / sierotipo o genotipo / nome del ceppo / anno di isolamento. Spesso la sigla IBV e la specie (solo se pollo) vengono omissi.

1.5 REPLICAZIONE DEL VIRUS

Il virus si attacca ai recettori della cellula ospite, viene adsorbito e l'*envelope* si fonde con la membrana cellulare grazie alla proteina S (in ambiente a pH neutro); questo provoca dei cambiamenti conformazionali nello *spike* che provocano la fusione tra la membrana cellulare e quella virale con conseguente rilascio del nucleocapside dentro la cellula (Fig. 5).

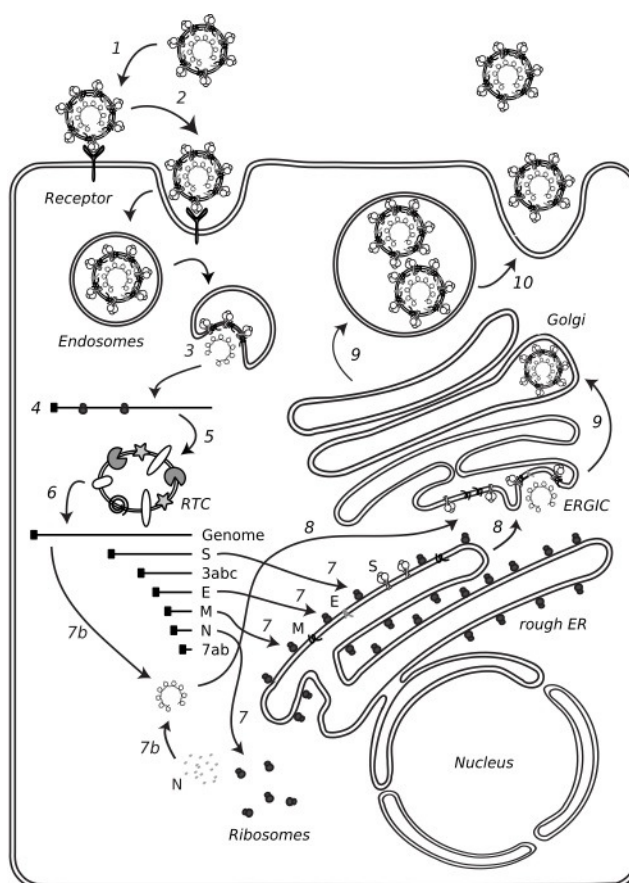


Figura 5 Ciclo di replicazione di un coronavirus (*The Virus*)

La regione UTR del virus è implicata nella trascrizione e replicazione del genoma virale. Una volta liberato nel citoplasma l'RNA genomico si comporta da mRNA e all'interno delle vescicole del Golgi provoca la traduzione primaria di una poliproteina che dopo processazione svolge la funzione di RNA polimerasi-RNA dipendente. Questa sintetizza un RNA che funge da stampo per la sintesi di altri 3 mRNA di lunghezza subgenomica che si sovrappongono in modo scalare (*nested RNA*) avendo in comune l'estremità 3'.

La formazione è guidata da una sequenza *leader* presente sul terminale 5' dell'RNA genomico che funge da *primer* ed è presente in ogni mRNA piccolo.

La trascrizione dell'RNA e la successiva traduzione delle proteine avvengono nel citoplasma della cellula e gli enzimi coinvolti interferiscono con la normale attività cellulare. Ogni mRNA codifica per una o più proteine (traduzione secondaria) strutturali e non strutturali.

Durante la traduzione le proteine S, M ed E sono inserite dentro la membrana del Golgi, vicino al reticolo del Golgi, mentre la proteina N è aggiunta al virione dopo l'interazione con la M per formare il nucleocapside. I complessi proteici del nucleocapside, insieme con il genoma a RNA, vanno a formare strutture elicoidali. Le nuove particelle virali sono trasportate alla membrana della superficie della cellula ospite all'interno di vescicole del Golgi che si fondono liberando per esocitosi le particelle virali neoformate.

2. EPIDEMIOLOGIA

2.1 SPECIE SENSIBILI

L'ospite naturale della Bronchite Infettiva aviare (IB) è il pollo (specie *Gallus gallus*); la malattia però si può presentare eccezionalmente anche nel fagiano (specie *Phasianus colchicus*). Il virus è stato segnalato (ma senza la malattia conclamata) anche nella faraona (specie *Numida meleagris*) e nel piccione (specie *Columbiformes*); ciò fa presupporre che questi animali possano essere potenziali vettori del virus e avere un ruolo importante nella trasmissione dell'infezione. La quaglia giapponese (specie *Coturnix japonica*), il gabbiano (genere *Larus*) e il topo si sono mostrati sensibili all'infezione sperimentale ma non sono stati osservati casi di malattia naturale (Pascucci, 1998).

Altre specie sensibili a coronavirus simili a IBV sono il pavone (specie *Pavo cristatus*) mentre virus IBV-like sono stati isolati nel tacchino (genere *Meleagris*), nell'alzavola (specie *Anas crecca*), nell'oca (genere *Anserinae*), nella pernice (genere *Alectoris*) e nell'anatra (genere *Anseriformes*) (Jackwood e De Wit, 2013).

2.2 MODALITÀ DI TRASMISSIONE

La Bronchite Infettiva aviare è una malattia molto contagiosa (bastano poche particelle virali per dare inizio a un'infezione) e si diffonde rapidamente tra gli animali: in 1-2 giorni tra capannoni diversi e 3-4 giorni tra allevamenti diversi (Charlton *et al.*, 2006). L'infezione avviene per ingestione, per inalazione attraverso le prime vie respiratorie o attraverso la congiuntiva di particelle virali; tramite contatto diretto tra ospite infetto e suscettibile, o attraverso il contatto indiretto con goccioline di aerosol fino a distanze elevate (anche 1,5-5 km; anche se il virus non sopravvive a lungo nell'ambiente esterno) (Pascucci, 1998).

La trasmissione diretta tramite aerosol è la via di diffusione più importante e comune, poiché le goccioline espulse da un soggetto in fase acuta della malattia sono molto ricche di particelle virali, infatti il virus in questa fase replica molto rapidamente.

L'infezione può avvenire anche tramite feci/urina o per contatto con oggetti contaminati trasportati da un capannone all'altro (come indumenti o scarpe dei lavoratori), all'interno dello stesso allevamento o in allevamenti diversi.

È presente anche una piccola percentuale di animali che funge da portatore ed elimina il virus anche per mesi dopo l'infezione (Charlton *et al.*, 2006).

La via verticale (madre-embrione) non è ancora stata dimostrata come possibile via di trasmissione; anche se, in uno studio del 1971, Cook dopo infezione in galline e galletti SPF ha isolato il virus per 2 settimane dal seme e per 1-7 settimane dalla membrana vitellina delle uova e persino da un piccolo numero di pulcini appena nati (anche se questi non presentavano sintomi clinici).

2.3 STORIA DELLA MALATTIA

La prima segnalazione di IB è stata fatta negli Stati Uniti, in North Dakota, nel 1930 e furono Schalk e Hawn i primi a descrivere la malattia in un articolo pubblicato nel 1931.

All'inizio era considerata solo una malattia dei polli giovani e si pensava fosse causata da un virus che dava una forma lieve di Laringotracheite; nel 1936 però Beach e Schalm videro che il virus era diverso da quello della Laringotracheite Infettiva aviaria e ne dimostrarono l'eziologia virale.

Un articolo importante fu pubblicato nel 1937 da Beaudette e Hudson che, isolando il virus nel liquido amniotico, capirono che questo poteva essere una fonte di propagazione dell'infezione per le uova embrionate.

In Italia IBV fu scoperto quasi contemporaneamente da diversi gruppi di ricerca, che dal 1956 in poi, in varie regioni italiane, isolarono e identificarono l'agente virale. Dagli anni '60 in poi IBV fu sempre una delle cause più frequenti di danni economici nelle aziende avicole, ma i sintomi furono da sempre controllati tramite la vaccinazione con il sierotipo Massachusetts. Nel 1962 Winterfield e Hitchner riportarono che alcuni ceppi di IBV causano la cosiddetta sindrome della nefrite-nefrosi.

Questi ceppi iniziarono a circolare anche in Italia; Rinaldi e Zanella li studiarono e li tipizzarono, vedendo che erano diversi da quelli americani e australiani.

Negli anni '70 sembra che IBV si sia un po' attenuata e la malattia primaria si sia presentata di rado, lasciando spazio a sintomi respiratori più lievi che però aprivano la strada a malattie batteriche secondarie, come la Colisetticemia. Negli anni '80 però ci fu una ripresa della malattia primaria in polli da carne vaccinati e nei riproduttori.

A partire da questi anni furono isolati molti ceppi appartenenti a genotipi differenti provenienti da vari paesi dell'Europa e non solo; ad esempio, dal 2011 è stato segnalato in Italia il ceppo denominato Q1, isolato in un allevamento di broiler (Toffan *et al.*, 2011).

In particolare il genotipo QX, analizzato in questo studio, è stato scoperto per la prima volta in Cina nel 1996 (associato a proventriculite) e il primo articolo pubblicato a riguardo fu

scritto da Wang *et al.* nel 1998; da qui il ceppo si diffuse nell'est della Russia nel 2001 e nell'ovest nel 2002.

In Europa il primo *report* sulla circolazione di un ceppo nefropatogeno simile al QX venne riportato nei Paesi Bassi tra il 2003 e il 2004 (Landman *et al.*, 2005).

Da allora il genotipo QX venne scoperto in vari paesi europei, fino al 2005 quando QX venne scoperto anche nell'Italia del Nord in polli rurali (Beato *et al.*, 2005a) e in gruppi appartenenti a filiere commerciali (Beato *et al.*, 2005b).

Nel Regno Unito il ceppo QX è stato riscontrato solo in tempi più recenti: nel 2008 in un gallo di razza Pekin (razza di origine cinese) che all'esame necroscopico presentava reni edematosi e nel 2010 in polli commerciali (Valastro *et al.*, 2010).

2.4 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Il ceppo di IBV considerato il capostipite è il genotipo Massachusetts (Mass), isolato per la prima volta negli anni '40 negli Stati Uniti, diffusosi poi in tutto il mondo (De Wit, 2011).

In una *review* di Jackwood del 2012 viene analizzata la situazione mondiale esaminando la distribuzione dei vari genotipi/sierotipi conosciuti.

Negli Stati Uniti il ceppo più diffuso è il ceppo Arkansas che, grazie alla sua capacità di evolvere, ha dato vita a molti altri ceppi simili denominati per questo *Arkansas-like*. Sono presenti inoltre genotipi di IBV denominati Delaware, Connecticut e Mass. Dal 1990 si è isolato anche il ceppo California con le sue varianti; negli ultimi anni sono stati scoperti i ceppi Georgia e South Carolina. Gli stessi genotipi sono stati identificati anche in America Latina, dove sono inoltre presenti i ceppi Chile e Colombia, BR1, BFR2, BR3 e recentemente il genotipo Q1 (Sesti *et al.*, 2014).

In Russia e nei paesi orientali dagli anni '90 è presente il genotipo Mass, assieme ai genotipi europei come il 793B, D274 e Italy 02.

Anche in Africa e India è molto presente il genotipo 793B, con ceppi locali come Israel e un genotipo presente soltanto in questa zona del mondo, il genotipo IS720.

In Cina e in Giappone sono sempre presenti i genotipi Mass e 793B, ma è importante sottolineare che in questa zona del mondo sono stati isolati per la prima volta dal 1996 in poi il genotipo QX e poco tempo dopo il genotipo Q1, i quali si stanno diffondendo in altri continenti.

In Australia invece non è presente l'usuale classificazione basata sulle differenze genomiche della proteina S, ma i sierotipi di IBV isolati sono stati raggruppati in 3 sottotipi: il sottotipo 1 comprende i sierotipi classici, come il primo ceppo isolato Australia/N1/62 (un

ceppo nefropatogeno) e il ceppo vaccinale attualmente utilizzato; mentre i sottotipi 2 e 3 comprendono i ceppi più recenti che spesso sono dei ricombinanti e provocano solamente sintomatologia respiratoria.

In Europa la situazione epidemiologica è stata studiata in maniera sistematica da Worthington *et al.* (2008), che hanno condotto uno studio dal 2002 al 2006. Il genotipo predominante, in percentuali diverse tra i vari paesi, è risultato essere il 793/B (si riscontra tra il 53.7% della Francia e il 18.4% del Belgio). Il secondo genotipo più diffuso è il genotipo Mass, che invece rappresenta il genotipo principale, soppiantando il 793B anche se di poco, in Germania e Olanda. Soltanto in Belgio e in Spagna la situazione risulta essere diversa: in Belgio il genotipo predominante è il D274, mentre in Spagna il principale è il genotipo Italy 02, anche se i precedenti genotipi (793B e Mass) sono comunque molto rappresentati in entrambi i paesi (Tab. 1).

Tabella 1 Genotipi di IBV isolati in vari stati dell'Europa occidentale tramite RT-PCR tra il 2002 e il 2006 (Worthington *et al.*, 2008)

	United Kingdom	France	Germany	Holland	Belgium	Spain	Western Europe
Number tested	1580	896	655	564	259	149	4103
Number IBV-positive	1024	460	345	347	158	85	2419
% IBV-positive	64.8	51.3	52.7	61.5	61.0	57.0	59.0
Proportion of each infectious bronchitis genotype (%)							
793B	32.4	53.7	27.5	26.5	18.4	25.9	33.8
Massachusetts	22.6	22.8	29.0	27.7	20.3	21.2	24.1
Italy02	19.8	6.7	1.4	6.3	1.9	48.2	12.6
QX-like	0	12.0	23.8	20.2	22.8	0	10.0
D274	7.0	1.1	11.9	12.4	25.3	4.7	8.5
Arkansas	12.8	0	0	1.7	5.1	0	6.0
B1648	0	1.3	0.3	0	0	0	0.3
D1466 ^a	1.4	0.9	3.5	4.3	4.4	0	2.3
Other ^b	4.1	1.5	2.6	0.9	1.9	0	2.5

Stooker *et al.*, in uno studio analogo ma più recente, hanno preso in considerazione i principali genotipi circolanti in Europa nel 2011 e ne hanno valutato la percentuale su 1322 campioni identificati mediante RT-PCR e tipizzazione mediante RRT-PCR (Tab. 2).

Confrontando i due studi si può osservare come in pochi anni il genotipo QX ha aumentato la sua presenza numerica (in tutti i paesi esaminati da entrambi gli studi) e anche il suo areale di distribuzione (è arrivato in Gran Bretagna e in Spagna), soppiantando i genotipi 793B e Massachusetts.

Tabella 2 Percentuali di 8 differenti genotipi di IBV riscontrati in alcuni paesi europei (modificata da Stoker et al., 2011)

IB	NL	Belgium	Germany	UK	France	Spain	Portugal	Turkey
IBQX	81%	58%	80%	31%	22%	42%	53%	0%
Mass	25%	31%	39%	39%	44%	31%	41%	53%
IB793B	17%	42%	17%	15%	67%	10%	19%	8%
D274	5%	10%	9%	13%	0%	18%	0%	0%
ARK	0%	3%	0%	51%	0%	2%	0%	0%
Italy 02	0%	0%	0%	1%	0%	45%	6%	0%
Variant2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	60%
D1466	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

In Italia dallo studio di Massi (2013) è possibile osservare come il genotipo 793/B è il più diffuso (56% dal 2011 al 2013) seguito dal genotipo QX (11-26% a seconda dell'anno considerato); gli altri genotipi (cioè, in ordine decrescente, Italy 02, Massachusetts, 624/I e D274) sono in diminuzione; mentre il nuovissimo genotipo Q1 sta aumentando in termini percentuali (dal 7% del 2012 al 14% dei primi mesi del 2013) (Tab. 3). Da questo studio non emerge una distribuzione geografica peculiare di alcuni genotipi; infatti quelli a maggiore diffusione appaiono uniformemente distribuiti su tutto il territorio nazionale, soprattutto nelle zone a più alta densità avicola.

Tabella 3 Identificazione molecolare dei ceppi di IBV in Italia (modificata da Massi, 2013)

	GENOTIPO							
	793B	624/I	Q1	D274	It02	Massachusetts	QX	Guangdong
Numero isolati anno 2011 (%)	56	27	0	0	3	4	11	0
Numero isolati anno 2012 (%)	56	1	7	1	0	9	26	0
Numero isolati da gennaio a maggio 2013 (%)	56	0	14	2	0	6.5	20	1

In un recente studio di Franzo *et al.* (2014) sono stati presi in esame alcuni allevamenti del Nord Italia. Sono stati identificati 83 allevamenti positivi ad IBV che successivamente sono stati genotipizzati. Il genotipo più rappresentato è risultato essere il genotipo QX-like (47,61%), seguito dal genotipo 793/B (38,09%); i meno rappresentati sono i genotipi Massachusetts (7,93%), Q1 (4,76%) e D274 (1,58%). Nello stesso studio però si fa notare che il metodo utilizzato non è in grado di discriminare tra ceppo vaccinale e ceppo di campo, ma gli autori sostengono che i genotipi 793/B trovati sono molto simili ai due vaccini

commercializzati in Italia (16 sono uguali al 100%), per cui la percentuale del genotipo di campo 793/B nella realtà sarebbe più bassa.

Probabilmente le percentuali dei vari genotipi trovate nello studio di Massi (2013) e in quello di Franzo *et al.* (2014) differiscono tra di loro perché, mentre nel primo studio sono state prese in esame principalmente galline ovaiole, normalmente vaccinate più volte con ceppi vivi attenuati appartenenti al genotipo 793B, nel secondo studio sono stati esaminati quasi solamente broiler del Veneto, vaccinati una sola volta o non vaccinati con il vaccino vivo attenuato del genotipo 793B.

La mancata identificazione di ceppi di IBV genotipo 793B, a seguito dell'interruzione della vaccinazione con tale genotipo in broiler del Nord Italia, ha permesso di confermare che le molte positività per tale genotipo siano dovute alla circolazione di ceppi di origine vaccinale (Franzo *et al.*, 2014).

3. PATOGENESI

Il processo patogenetico causato da IBV dipende da molti fattori, riguardanti sia il soggetto esposto sia il ceppo virale e sono di seguito elencati:

- virulenza del ceppo e suo tropismo;
- sensibilità dell'ospite legata al sistema immunitario (ad esempio soggetti immunodepressi per la presenza della malattia di Gumboro che riduce la risposta immunitaria sia alla vaccinazione sia all'infezione di campo) e alla linea genetica. Le razze leggere sono più sensibili all'infezione rispetto a quelle pesanti, anche se rispondono meglio alle vaccinazioni. Jordan (1995), al contrario, riporta come le razze pesanti siano più colpite nella forma renale;
- stress: temperatura fredda $< 16^{\circ}\text{C}$ (Cumming, 1969) soprattutto nei primi giorni di vita, sovraffollamento, polveri, poca ventilazione e presenza di ammoniaca aumentano la sensibilità a IBV;
- sesso: secondo Cumming (1969) e Jordan (1995) i maschi sono più suscettibili delle femmine e presentano una mortalità più elevata (soprattutto nelle forme renali);
- alimentazione: una dieta con farina di carne $> 3\%$ del volume totale, cioè con un elevato livello proteico, favorisce l'infezione (Cumming, 1969) e se questa è già presente ne peggiora il decorso (Jordan, 1995). Anche il livello di calcio è un fattore importante; ad esempio uno studio che ha analizzato il rapporto tra dieta e suscettibilità al virus è stato quello di Glahn *et al.* (1989): ad un primo gruppo di polli è stata data una dieta ricca di calcio, successivamente questi soggetti sono stati infettati con il ceppo nefropatogeno Gray, il risultato è stato che molto frequentemente si sono verificati episodi di malattia con urolitiasi e lesioni renali; in un secondo gruppo invece l'infezione è stata introdotta 8 settimane prima del cambio verso una dieta ricca di calcio e in questi animali non si è verificata urolitiasi;
- presenza o assenza di anticorpi materni, soprattutto rispetto alle lesioni a livello di sistema riproduttivo femminile: secondo Broadfoot *et al.* (1954) animali che presentano un alto livello di anticorpi di origine materna precedentemente all'infezione sperimentale con IBV fatta in giovane età, hanno meno lesioni a livello di ovidutto all'esame autoptico;
- riguardo l'età di infezione ci sono pareri discordanti: secondo Pascucci (1998) gli animali giovani non sono più sensibili all'infezione, anzi l'età non è determinante;

invece per molti altri autori l'età è un fattore molto importante, tanto che animali con meno di 2 settimane presentano una nefrite più severa e un maggior tasso di mortalità rispetto agli adulti;

- co-infezione con altre patologie sia batteriche che virali (come la malattia di Newcastle o la Laringotracheite Infettiva), che possono favorire la comparsa di una forma respiratoria più grave e prolungata. Lo stesso virus della Bronchite provoca maggior suscettibilità ad altre malattie respiratorie secondarie: ad esempio *E. Coli*, *M. Gallisepticum* (Adler *et al.*, 1962), *M. Synoviae* (Springer *et al.*, 1974), *M. Imitans* e *H. Paragallinarum*; sono stati effettuati anche studi sia *in vitro* che *in vivo* che hanno valutato l'interferenza tra IBV e *Metapneumovirus* nella Sindrome della testa gonfia del pollo (Jones *et al.*, 1998).

Il virus della Bronchite Infettiva si localizza dapprima nelle cellule epiteliali della mucosa respiratoria delle prime vie aeree (a livello dei turbinati nasali, nelle ghiandole di Harder, nella congiuntiva), si diffonde poi in trachea dove può essere trovato ad alte concentrazioni per i primi 3-5 giorni p.i. (De Wit, 2010) e arriva fino ai polmoni e ai sacchi aerei.

Il virus provoca all'inizio la paralisi delle ciglia vibratili presenti nell'epitelio della mucosa respiratoria (un fenomeno detto ciliostasi) soprattutto a 4 e 7 giorni p.i. fino a distruggerle (Benyeda *et al.*, 2009) e provocare necrosi degli epitelii, riducendo le secrezioni mucose e favorendo l'ingresso dei batteri secondari (una delle infezioni secondarie più frequenti è data da *Escherichia coli*). Si ha perdita delle cellule ciliate epiteliali, le quali secondo uno studio di Kotani *et al.* (2000) iniziano a rigenerare a partire da poche cellule basali immature dal 4°-5° giorno p.i. e al 13° giorno tutto l'epitelio ciliato ritorna all'aspetto e alla funzionalità normale. Il titolo virale è massimo il 3° giorno post-infezione per persistere altri 2-5 giorni (titoli simili si trovano sia nelle prime vie respiratorie che nei polmoni e nei sacchi aerei). Poi il titolo virale decresce per infine scomparire. In alcuni studi il virus è stato ritrovato nelle cavità nasali fino a 27 giorni post-infezione (nei pulcini infettati a 1 giorno) e in trachea fino a 19 giorni post-infezione (in galline infettate a 40 settimane) con un ceppo di IBV appartenente al genotipo Italy 02 (Dolz *et al.*, 2012).

Dopo l'infezione, nel giro di 1-2 giorni, IBV viene trasportato nell'organismo dal sistema circolatorio e linfatico e provoca una fase viremica; da qui si localizza a vari organi: reni, apparato riproduttivo sia maschile che femminile (ovidotti e *rete testis*), sistema linfatico e organi linfatici come la borsa di Fabrizio.

Nell'apparato riproduttivo femminile il principale sito di replicazione è l'ovidutto e, in particolare, il *magnum* (dove viene sintetizzato l'albume) e l'infundibolo (in cui avviene la fecondazione) (Tosi, 2013); nello studio di Chousalkan e Roberts (2007) è riportata la descrizione delle alterazioni cellulari dell'ovidutto nei 30 giorni p.i.: nell'infundibolo il virus di IBV provoca la perdita delle ciglia delle cellule epiteliali sia nell'ampolla (la parte prossimale) sia nella regione calazifera (quella distale) dai 10 giorni p.i e per tutto il tempo dell'osservazione; queste lesioni sono state osservate simili ma più gravi nel *magnum* (soprattutto nelle cellule granulari della mucosa e in quelle che rivestono le ghiandole tubulari, che sintetizzano ovomucina e ovoalbumina).

IBV è in grado inoltre di replicare anche a livello di tubuli e dotti renali, ma si ritrova più frequentemente (per 7-8 giorni p.i.) nelle cellule epiteliali dei dotti collettori, tubuli collettori, dotti contorti distali e anse di Henle. IBV appartenente al genotipo Italy 02 è stato rilevato fino a 21 giorni post-infezione nei reni di polli infettati a 1 giorno di vita.

Chong *et al.* (1982) hanno condotto uno studio infettando con un ceppo nefrogeno (il ceppo T) un gruppo di polli a 1 e 15 giorni di età e li hanno osservati fino alle 30 settimane di vita. Il 35% dei soggetti ha sviluppato nefrite cronica progressiva anche se presentava titoli anticorpali sierici elevati.

Chen e Itakura (1997) invece hanno inoculato per via tracheale un ceppo nefropatogeno di IBV (denominato MA87) in polli SPF di 14 giorni e sono state osservate le lesioni istologiche e immunoistochimiche. Negli stadi precoci erano presenti danni a livello tubulo-duttale non molto gravi, ma nello stadio tardivo era presente nefrite interstiziale cronica con noduli linfoplasmocitari. Dopo 2 giorni post-infezione i gruppi infettati iniziavano ad avere i primi sintomi respiratori e tra 3 e 11 giorni post-infezione si osservava un aumento di consumo di acqua con feci molli bianco-verdastre per l'infezione renale. Secondo Tosi (2013) IBV replica in tutti i segmenti dei tubuli renali, soprattutto nell'epitelio dei tubuli contorti distali, ansa di Henle e dotti collettori; questa alterazione della struttura provoca insufficienza renale acuta.

Un titolo virale elevato a livello renale non sempre è significativo della presenza di lesioni renali (Ambali e Jones, 1990). Si è infatti osservato come il ceppo Moroccan G, pur presentando titoli simili nel rene e in trachea, provoca lesioni macroscopiche solo a livello dell'apparato respiratorio.

Il virus può essere ritrovato anche in alcuni tratti dell'apparato digerente (come esofago, proventriglio, tratti intestinali come tonsille cecali, duodeno, digiuno o borsa di Fabrizio, fino

al retto e cloaca) e qui può persistere anche per mesi. Il virus della Bronchite è stato isolato da tamponi esofagei (però le particelle virali potrebbero provenire dalla trachea), mentre replica sicuramente nel proventriglio (Yu *et al.*, 2001; Benyeda *et al.*, 2010) dove è in grado di causare una sindrome infiammatoria. L'intestino è considerato il sito responsabile della persistenza di IBV nell'ospite per lunghi periodi (sia per ceppi di campo che vaccinali), probabilmente per la continua circolazione del virus nei gruppi o per la riattivazione dell'infezione dopo un periodo di latenza; questo aspetto è stato dimostrato, nel 1995, nell'esperimento di Bhattacharjee *et al.* dove un gruppo di animali infettati a 1 giorno di vita sono poi stati trattati all'età di 12 settimane con ciclosporina (un immunosoppressore dei linfociti T) e ciò ha riattivato il virus. Se l'organismo presenta anticorpi neutralizzanti il virus può entrare in una fase di latenza. L'infezione latente può riattivarsi anche in situazioni stressanti e variazioni umorali (come il raggiungimento della maturità sessuale o l'entrata in ovodeposizione) o, come descritto in precedenza, a seguito di trattamenti immunodepressivi.

La persistenza del virus nei vari tessuti dipende da fattori legati all'ospite e al ceppo virale, ma è risultata essere in generale:

- Trachea 14-29 giorni,
- Reni 15-30 giorni,
- Intestino > 6 mesi,
- Borsa di Fabrizio > 6 mesi,
- Sperma 15 giorni,
- Ovaio e ovidotto 11 giorni,
- Uova 45 giorni,
- Feci 5 mesi. (Pascucci, 1998).

La capacità di IBV di replicare soprattutto nelle cellule epiteliali di vari organi e tessuti sembra essere dovuta al legame della proteina S con l'acido sialico che si trova sulla superficie di questo tipo di cellule. Il ruolo esatto di tale proteina nella patogenicità virale è tuttora discusso, ma è sicuro che la sua presenza non è sufficiente a causare sintomatologia e lesioni. Infatti si pensa che la patogenicità dipenda anche dalla proteina non strutturale N del nucleocapside (in particolare NSP3), che associata alla S sia in grado di determinare il livello di patogenicità. A conferma di tale ipotesi Phillips *et al.* (2011) hanno analizzato il genoma di 3 differenti ceppi di campo e di 3 ceppi attenuati ottenuti da questi. Nel processo di attenuazione è risultato che la proteina NSP3 ha avuto una grande quantità di variazioni amminoacidiche, mentre la proteina S ne ha avute molte di meno. Quando poi sono stati

infettati animali adulti con tali virus attenuati, questi non hanno provocato sintomatologia clinica e hanno avuto un basso tasso di replicazione rispetto ai virus patogeni dello stesso sierotipo. Secondo gli autori, questo studio suggerisce che la proteina NSP3 abbia un ruolo importante nella patogenicità e che cambiamenti in questa proteina riducano la replicazione del virus nei tessuti dell'ospite.

Alcuni studi hanno ipotizzato che in particolare due domini di S siano implicati nell'attacco del virus alle cellule, i cui recettori si trovano soprattutto nelle cellule polmonari ed enteriche (Schultze *et al.*, 1992; Kuo *et al.*, 2000).

Dagli anni '50 si è scoperto che esistono ceppi specifici di IBV nefropatogeni che hanno il rene come organo bersaglio e altri che dapprima provocano lesioni respiratorie e poi vanno a localizzarsi nel rene dando la sindrome nefrite-nefrosi (Mork *et al.*, 2014). Tra i ceppi in grado di dare lesioni sia all'apparato respiratorio che urinario ci sono quelli appartenenti al genotipo QX.

In uno studio di Benyeda *et al.* (2009), sono stati inoculati 5 differenti ceppi del genotipo QX-like, isolati a partire da differenti organi, in polli SPF di un giorno di vita; un gruppo è stato infettato con il genotipo Massachusetts 41 (M41) e un altro con il 793/B.

In tutti i 7 gruppi sono stati osservati sintomi respiratori, come scolo nasale, oltre a sintomi generici quali depressione e penne arruffate, ma solo nel gruppo infettato con il ceppo cinese QX è stata osservata diarrea acquosa. All'esame necroscopico è stata osservata iperemia con essudato catarrale in trachea dal 4° giorno p.i., sacchi aerei ispessiti con essudato, mentre solo nei ceppi QX sono state osservate lesioni macroscopiche (raramente presenti) e microscopiche a carico dell'apparato genitale femminile e nefrite-nefrosi a partire dall'11° giorno p.i. Gli autori affermano che con questo studio si è potuto notare come tutti gli animali infettati con ceppi QX-like hanno sviluppato lesioni renali e dell'apparato riproduttivo più severe rispetto a quelli infettati con ceppi appartenenti al genotipo M41 o 793/B e inoltre che non ci sono differenze significative tra i vari ceppi QX-like nelle lesioni ai differenti organi.

Il genotipo QX è stato anche ritrovato ad alti titoli nell'apparato digerente, in particolare nel proventriglio (Ganapathy *et al.*, 2012), mentre queste lesioni non sono state riportate nel precedente studio di Benyeda *et al.* (2009).

4. SINTOMATOLOGIA E LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE

L'infezione da virus della Bronchite Infettiva può essere asintomatica o dar vita ad una sintomatologia a carico dell'apparato respiratorio (colpito di solito per primo) o riproduttore e secondariamente si diffonde al resto dell'organismo.

I sintomi specifici di ogni apparato sono accompagnati da sintomi generici, come: malessere generalizzato, depressione, crescita ritardata e abbattimento, calo di peso, il consumo di cibo cala significativamente mentre aumenta il consumo di acqua (l'animale presenta ipertermia), è possibile inoltre trovare gruppi di animali rannicchiati sotto sorgenti di calore (cappe riscaldanti).

Di seguito vengono riportati i sintomi e le lesioni differenziati per apparato, pur tenendo presente che in alcune occasioni l'infezione da IBV colpisce più distretti, dando vita a sintomatologia variabile e lesioni che interessano più organi.

4.1 APPARATO RESPIRATORIO

Gli animali che vengono infettati da ceppi di IBV con tropismo per l'apparato respiratorio presentano una sintomatologia varia che comprende: tosse, respiro affannoso, dispnea e respiro a becco aperto con rantoli acuti. Sono presenti soggetti che starnutiscono, presentano scolo oculo-nasale da acquoso a catarrale, scuotono la testa e a volte presentano edema e leggero rigonfiamento dei seni.

Alla necropsopia sono visibili le seguenti lesioni macroscopiche: sinusite e tracheite con presenza di essudato sieroso, catarrale o caseoso (Fig. 6), polmonite. I bronchi presentano lesioni simili a quelle della trachea e i polmoni sono congesti; anche i sacchi aerei sono ispessiti e congesti con pareti opache e in alcune occasioni è possibile osservare essudato sieroso o caseoso (Fig. 7) (Cook *et al.*, 2012).

Nei polli giovani sono presenti anche tappi caseosi o purulenti giallastri a livello di biforcazione tracheale e di bronchi, che possono dare morte per asfissia (Pascucci, 1998); invece nei polli da carne con più di 6 settimane di vita i segni clinici possono essere poco specifici e la malattia può continuare asintomatica per mesi.

Microscopicamente dalle 18 ore p.i. in trachea e nei bronchi è possibile trovare essudato catarrale fino a caseoso, è visibile la perdita delle ciglia con iperplasia e metaplasia dell'epitelio, la perdita delle ghiandole mucose, edema e infiltrazione diffusa di cellule infiammatorie (soprattutto monociti-macrofagi e linfociti T).



Figura 6 *Tracheite con edema e congestione (Cornell University)*

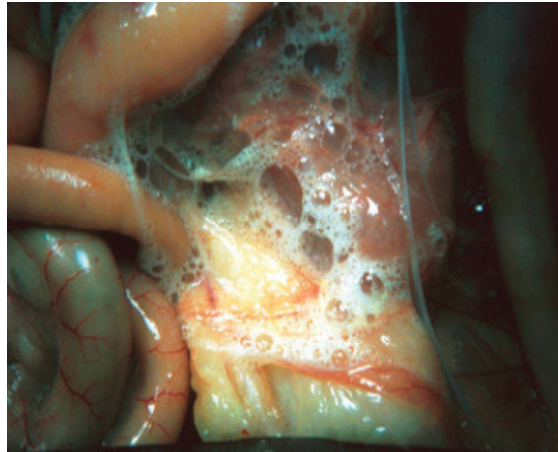


Figura 7 *Aerosacculite schiumosa (Jackwood e De Wit, 2013)*

4.2 APPARATO URINARIO

Il virus della Bronchite Infettiva è l'unico coronavirus in grado di replicare e produrre lesioni a carico dell'apparato urinario. I polli presentano sintomi relativi a lesioni a carico dell'apparato urinario, come: penne arruffate e sporche di feci per la diarrea, polidipsia con conseguente poliuria (che si nota osservando la lettiera molto umida). Macroscopicamente i reni si presentano all'inizio ingrossati e congesti, poi appaiono pallidi, con tubuli e ureteri distesi per l'accumulo di urati e spesso di calcoli composti da urati (Fig. 8 e Fig. 9).

Microscopicamente il virus provoca una nefrite interstiziale (acuta o subacuta-cronica) che nella fase acuta presenta degenerazione granulare, vacuolizzazione e desquamazione delle cellule epiteliali dei dotti collettori, tubuli collettori, tubuli contorti distali e anse di Henle. Vi è inoltre una infiltrazione massiva di eterofili nell'interstizio. Il passaggio alla fase cronica può avvenire con o senza replicazione del virus. Le lesioni a carico dei tubuli sono maggiori nella midollare.



Figura 8 Reni aumentati di volume con tubuli e ureteri dilatati per la presenza di urati (Jackwood e De Wit, 2013)

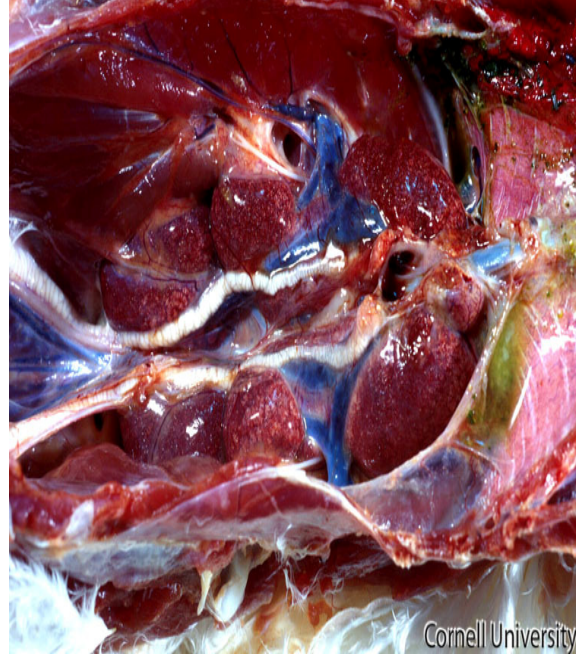


Figura 9 Reni aumentati di volume con tubuli e ureteri dilatati per la presenza di urati (Cornell University)

4.3 APPARATO RIPRODUTTORE

Esistono due sindromi a carico dell'apparato riproduttivo, una che colpisce gli animali adulti e una i giovani immaturi.

La più frequente riguarda gli animali adulti in qualsiasi momento dell'ovodeposizione. In questi animali IBV provoca sintomi generali come il calo dell'ovodeposizione (dal 10% anche fino al 50% e oltre); se il calo della produzione è stato lieve, il livello tornerà nella norma in 1-2 settimane, se il calo è stato importante tornerà alla quantità precedente in 6-8 settimane, ma in alcuni casi questo non avviene (Jordan, 1995; Pattison *et al.*, 2008). Non è ancora chiaro come mai l'animale infetto cessi l'ovodeposizione: secondo alcuni studiosi IBV provocherebbe alterazioni ormonali, secondo altri la perdita delle ciglia della mucosa dell'ampolla che servono per il movimento degli ovuli.



Figura 10 Uova con varie anomalie: parete sottile, rugosa, o con perdita della forma caratteristica (per gentile concessione di R.C. Jones)

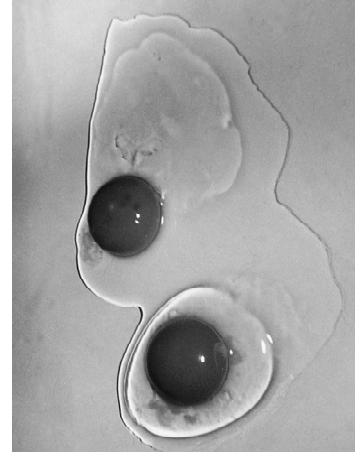


Figura 11 Sopra: uovo di gallina esposta a IBV a 1 giorno di età (albume acquoso). Sotto: uovo normale (Jackwood e De Wit, 2013)

Oltre alla mancata/ridotta produzione di uova, vi è un peggioramento della qualità delle stesse che appaiono con un guscio più fragile, poroso o più rugoso e corrugato, di forma non ovoidale e asimmetrica, può essere pallido, non pigmentato o presentare depositi calcarei, a volte è sottile o manca del tutto (Fig. 10). Il contenuto interno delle uova appare anch'esso alterato: l'albume è acquoso e meno viscoso (Fig. 11), con calaze rotte e con il tuorlo che galleggia libero; nell'albume e nel tuorlo possono essere presenti piccole emorragie.

Macroscopicamente l'ovidutto a volte si presenta rimpicciolito con parete sottile e spesso contiene grandi cisti acquose, ma a volte può apparire di dimensioni normali; i follicoli ovarici sono inoltre flaccidi; ci può essere abbondante quantità di liquido (da 0.5 a 1.5 litri di essudato) che provoca addome teso e fluttuante, costringendo l'animale ad assumere il tipico aspetto "a pinguino" (Massi *et al.*, 2010). Nelle forme gravi può esserci rottura dell'ovaio con conseguente peritonite. La gravità e la durata del fenomeno sono multifattoriali, dipendono dalla virulenza del ceppo, dalla fase di deposizione e dallo stato immunitario del soggetto e i sintomi sono molto individuali.

Microscopicamente nell'ovidutto si osserva riduzione in altezza delle cellule epiteliali, tendenza delle cellule a calice ad assumere forma cuboidale, dilatazione delle ghiandole, fibroplasia ed edema, infiltrazione dei tessuti subepiteliali da parte di monociti e proliferazione di follicoli linfoidi (addensamenti di piccoli linfociti).

Chousalkal e Roberts (2007) hanno dimostrato che alcuni ceppi di IBV possono infettare la gallina ovaiole senza causare calo della deposizione o alterazioni del guscio, ad eccezione del colore; in questo studio gli autori hanno valutato le alterazioni microscopiche di ogni tratto dell'apparato riproduttore nei 30 giorni post-infezione. Hanno osservato nell'infundibolo, dai 10 ai 12 giorni, una perdita delle ciglia delle cellule epiteliali sia nella parte prossimale (ampolla) sia nella distale (regione calazifera); nel *magnum* le lesioni erano simili ma di gravità maggiore, soprattutto nelle cellule granulari della mucosa (che sintetizzano ovomucina) e in quelle che rivestono le ghiandole tubulari (che sintetizzano ovoalbumina). Proprio tali lesioni sembrano essere causa delle alterazioni a carico dell'albume, che si presenta più acquoso perché contiene meno proteine.

La seconda sindrome, più rara, a carico dell'apparato riproduttore riguarda animali infettati a pochi giorni di vita. Macroscopicamente IBV provoca un anormale sviluppo dell'ovidotto (soprattutto nel terzo medio), spesso incompleto o a volte addirittura assente. I residui possono essere non evidenti o cistici e raramente l'ovidotto ha una struttura e una funzionalità solo leggermente anormale. I primi studi sull'argomento vennero effettuati da Broadfoot *et al.* (1954) i quali hanno infettato dei gruppi di pollastre sieronegative per IBV ad una età compresa tra 1 e 18 giorni e tutti i gruppi hanno presentato una forma respiratoria; poi alla deposizione sono state osservate lesioni varie a livello di ovidotto in soggetti apparentemente sani (da atrofico a funzionante anche se di dimensioni inferiori alla norma, a lesioni cistiche nella parete soprattutto della parte centrale e nei legamenti); in alcuni casi c'era un numero elevato di ovuli immaturi. Questi soggetti prendono il nome di "false ovaiole" (Fig. 12). Una volta raggiunta la maturità le galline ovulano normalmente, ma le uova completamente formate o il tuorlo finiscono in cavità addominale invece di essere convogliate nell'ovidotto (*internal layers*). Se invece quest'ultimo è presente ma anormale, le uova vengono deposte ma presentano difetti nel guscio e nell'albume.



Figura 12 A sinistra apparato riproduttore normale, a destra apparato riproduttore con sviluppo inadeguato (gentilmente concessa da R.C. Jones)

Microscopicamente si osserva ipoplasia dell'epitelio e delle ghiandole tubulari, con lume spesso otturato.

Nel maschio invece sono stati effettuati studi da Boltz *et al.* (2006), dove è stata messa in relazione l'infezione da IBV con la presenza di concrezioni ricche di calcio nell'epididimo di soggetti infettati tra le 2 e le 14 settimane di età. Tali lesioni a carico dell'epididimo riducono la fertilità maschile spesso in modo permanente. Non è ancora certa però la spiegazione di queste “*epididymal stones*” e secondo alcuni studiosi sono legate a una dieta ricca di calcio.

4.4 APPARATO DIGERENTE

Il virus della Bronchite Infettiva provoca sintomi a carico dell'apparato digerente molto aspecifici, come diarrea e perdita di peso (correlati al fatto che l'animale presenta febbre e depressione).

4.5 ALTRI ORGANI E TESSUTI

IBV è stato isolato in diversi organi linfatici, come le ghiandole di Harder e la borsa di Fabrizio; in uno studio di MacDonald e McMartin (1976), sono state osservate lesioni macroscopiche in tutti gli individui oggetto di studio tra il giorno 5 e il giorno 16, come la presenza di materiale filamentoso bruno-giallastro all'interno del lume prodotto dalla risposta infiammatoria dei linfociti. L'infezione può accompagnarsi a miopatia a carico dei muscoli pettorali superficiali e profondi che appaiono pallidi e atrofici a causa della necrosi. La relazione tra IBV e miopatia non è stata dimostrata con certezza (Almeida *et*

al., 2012) e alcuni autori dubitano che IBV sia responsabile di tali lesioni (De Wit, comunicazione personale).

In alcuni soggetti è presente la “gotta viscerale”: depositi di urati che oltre al rene si accumulano anche nel peritoneo, pericardio e articolazioni.

La mortalità varia notevolmente a causa di fattori intrinseci ed estrinseci al virus (ad es.: età degli animali, linea genetica, squilibri nutrizionali soprattutto proteine e minerali). Nei focolai di malattia più gravi la mortalità può arrivare anche al 70% (Jordan, 1995).

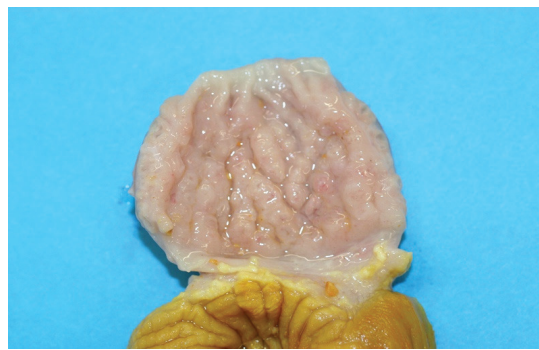


Figura 13 Proventricolite. Si nota la parete ispessita con prominenza della papilla. (Toffan et al., 2013)

Il genotipo QX, oggetto della presente tesi, è in grado di infettare l'apparato respiratorio dando sintomatologia analoga a tutti gli altri genotipi della Bronchite Infettiva.

Molti ceppi QX-like sembrano avere un tropismo spiccato per l'apparato urinario dove provocano nefrite e nefrosi soprattutto negli animali giovani (De Wit, 2011), a volte anche senza sintomi respiratori.

A livello di apparato riproduttivo, i ceppi QX-like sono in grado di provocare dilatazione dell'ovidotto con accumulo di liquido sieroso nel lume e lesioni cistiche (Benyeda *et al.*, 2010). Molti autori hanno ipotizzato la correlazione tra il genotipo QX-like e il fenomeno delle “false ovaiole”. In uno studio di Massi *et al.* (2010) è stato identificato il genotipo QX-like in galline ovaiole della Romagna di 19 settimane di età, a 22 settimane sono state riscontrate lesioni all'apparato riproduttivo ascrivibili al fenomeno delle “false ovaiole” (accompagnate da riduzione della deposizione fino all'80%). Sebbene tale gruppo di ricerca abbia identificato il virus a 19 settimane di età si ritiene che questo problema si generi in soggetti privi di immunità passiva materna

con anticorpi omologhi in seguito ad un'infezione precoce, nei primissimi giorni di vita, di virus IB patogeno per l'apparato riproduttore (De Wit, 2006).

Il genotipo QX è stato ritrovato sperimentalmente anche in alcuni animali che presentavano sintomatologia a livello di apparato digerente (Tosi, 2013). In uno studio di campo condotto da Ganapathy *et al.* (2012) è stato possibile identificare IBV genotipo QX in un gruppo di broiler commerciali in Gran Bretagna che presentavano come lesione principale una proventriculite (Fig. 13).

5. DIAGNOSI

I sintomi clinici e le lesioni macroscopiche e istologiche non sono considerate patognomoniche; i sintomi respiratori sono infatti comuni a più malattie causate da vari patogeni (come il *Metapneumovirus* aviare o il virus della Laringotracheite), il calo dell'ovodeposizione e la cattiva qualità delle uova possono essere causati da fattori sia infettivi che non-infettivi o da una cattiva gestione dell'allevamento, lo sviluppo anomalo dell'ovidotto e la sintomatologia a carico dei reni possono essere dati anche da deficit nutrizionali o da cause sconosciute (Cook, 2008).

Perciò la prova dell'avvenuta infezione da Bronchite Infettiva può essere effettuata soltanto tramite indagini di laboratorio che prevedono l'isolamento del virus o la ricerca dell'antigene virale (diagnosi diretta), oppure la presenza di anticorpi specifici nel siero (diagnosi indiretta).

La diagnosi di Bronchite Infettiva include, se possibile, l'identificazione del genotipo o del sierotipo virale ed eventualmente anche l'analisi delle sequenze genomiche per avere maggiori informazioni sul ceppo identificato.

L'**isolamento virale** viene effettuato su diversi substrati a partire da campioni di vari organi prelevati alla necropsopia o da tamponi rino-faringei, tracheali o cloacali (Gelb e Jackwood, 2008). Il virus può essere ritrovato facilmente, e campionato per la diagnosi, in trachea nei primi stadi dell'infezione quando la replicazione avviene alla massima velocità, mentre diventa difficile isolarlo dopo 7-10 giorni p.i. Successivamente può essere ricercato invece in altri organi: come reni, polmoni, proventricolo o nel tratto intestinale (prelevando le tonsille cecali o tramite tamponi cloacali) o nelle feci (Charlton *et al.*, 2006). Il tratto riproduttivo invece non è un buon sito di prelievo perché qui il titolo virale non è costante. Questo materiale viene messo a contatto per circa 30-60 minuti con un brodo di coltura contenente antibiotici (penicillina 10000 UI e streptomina 10 mg/ml) per ridurre la possibilità di contaminazione da parte di batteri o funghi; viene poi centrifugato e filtrato per rimuovere eventuali contaminanti (Gelb e Jackwood, 2008). È possibile anche utilizzare animali sentinella, quali polli SPF, che vengono introdotti in un gruppo e campionati settimanalmente prelevandone le trachee e sottoponendole agli esami standard (Cavanagh e Naqi, 2003).

Per la diagnosi diretta è possibile utilizzare varie metodiche che di seguito vengono riportate:

- Isolamento virale su uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni inoculate in cavità allantoidea con 0.1-0.2 ml di surnatante che deriva da campioni o organi degli animali da sottoporre al test. Le uova sono osservate giornalmente, con una mortalità tra il 2° e 7° giorno considerata specifica del virus della Bronchite Infettiva (Gelb e Jackwood, 2008). Il massimo titolo virale si riscontra nel fluido allantoideo 1-2 giorni post-inoculazione, qualche giorno più tardi se il virus non è adattato al sistema di coltura. Per far adattare il virus e permetterne la visualizzazione delle lesioni o la mortalità a carico dell'embrione vengono eseguiti anche 3-5 passaggi (i fluidi allantoidei di tutte le uova sono uniti assieme e diluiti in un brodo contenente antibiotici per poi essere inoculati in un altro gruppo di uova) (Cook, 2008). A partire dal 3° giorno post-inoculazione, se il virus di IBV è presente, si possono vedere le lesioni tipiche della Bronchite: il mesonefro degli embrioni che sopravvivono al 5°-7° giorno post-inoculazione contiene urati (questa lesione è presente spesso anche in altre infezioni, come quella sostenuta da *Adenovirus*), si osservano inoltre alterazioni a carico del tuorlo e del fluido allantoideo che aumenta di volume (Cavanagh e Naqi, 2003), polmoni congesti e sacchi aerei con essudato, l'amnios e l'allantoide si presentano ispessiti e si attaccano all'embrione. L'embrione si presenta accartocciato con una forma sferica (Fig. 14), con piedi deformi e compressi contro la testa e piumino non sviluppato (Jackwood e De Wit, 2013). IBV inoltre provoca nanismo e ritardo di crescita dell'embrione e alcuni ceppi più letali danno anche emorragie cutanee (Gelb e Jackwood, 2008). Microscopicamente è presente congestione e necrosi estesa dei reni, manicotti perivascolari e necrosi nel fegato tra il 1° e il 3° giorno p.i., nefrite interstiziale con edema e distensione dei tubuli contorti prossimali, edema dell'amnios e della membrana corion-allantoidea (Loomis *et al.*, 1950). Ceppi virali, sierotipi e genotipi diversi provocano lesioni a carico dell'embrione e delle varie membrane dell'uovo, differenti in gravità e tempistica (Jackwood e De Wit, 2013).

È importante differenziare il virus della Bronchite Infettiva dal virus della malattia di Newcastle (molto comune nel pollo) o da altri virus in grado di causare mortalità e lesioni embrionali: per fare ciò si valuta la capacità del liquido allantoideo di agglutinare gli eritrociti, questa è molto alta nella Newcastle, molto bassa nella Bronchite; in ogni caso è necessario confermare il sospetto di diagnosi mediante l'utilizzo di tecniche di identificazione virale quali ad esempio l'osservazione diretta al microscopio elettronico, l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare, l'ELISA e l'immunoistochimica.



Figura 14 A sinistra embrione normale di 16 giorni, a destra embrione della stessa età con lesioni tipiche da IBV (Cavanagh e Naqi, 2003)

- Isolamento su organocolture di anelli tracheali di embrioni di pollo (TOC) SPF di 18-20 giorni. Le trachee vengono prelevate dagli embrioni, tagliate ad uno spessore di 0.5-1 mm utilizzando un apposito sezionatore di tessuti e trasferite in provette di vetro sterili, contenenti un singolo anello all'interno insieme a terreno di coltura. IBV provoca ciliostasi che inizia a 24-48 ore p.i. già dal primo passaggio, eliminando la necessità di passaggi multipli (Gelb e Jackwood, 2008). L'effetto ciliostatico può però essere provocato anche da altri patogeni come *Metapneumovirus* (aMPV). È da notare come IBV dia una ciliostasi precoce e più estesa rispetto a quella provocata da aMPV (Jackwood e De Wit, 2013). In ogni caso per confermare la presenza di IBV vengono effettuate le stesse metodiche di identificazione elencate per l'isolamento su uova embrionate.
- Isolamento su colture cellulari ottenute da cellule renali o da cellule epatiche di pollo o di embrione di pollo. Il virus, però, deve adattarsi a tali substrati in modo da raggiungere un titolo virale e un effetto citopatico rilevabile. Il titolo più alto si raggiunge a 14-36 ore p.i. con un pH ottimale di 6.5. A 6 ore post-inoculazione le cellule iniziano a formare sincizi, dopo 18-24 ore i sincizi contengono circa 20-40 o più nuclei che diventano vacuolizzati e picnotici (Cavanagh e Naqi, 2003). Questo metodo però è sempre meno utilizzato. In ogni caso per confermare la presenza di IBV vengono effettuate le stesse metodiche di identificazione elencate per l'isolamento su uova embrionate.
- Inoculazione intratracheale su polli suscettibili di campioni o dei fluidi provenienti dalle uova embrionale. Sugli animali sono visibili i sintomi respiratori tipici della Bronchite Infettiva da 18-36 ore p.i.; questo test viene eseguito per avere la conferma eziologica della malattia osservata in allevamento e se si sospetta un nuovo ceppo virale. Dopo 2 settimane

viene prelevato il siero e sottoposto a test di virus-neutralizzazione (VN) per determinarne il sierotipo (Cavanagh e Naqi, 2003).

Identificazione virale con metodi immunoistochimici: se non è indispensabile isolare il virus, si possono utilizzare metodi che usano anticorpi monoclonali o policlonali IBV-specifici, come l'immunofluorescenza e l'immunoperoxidasi. L'immunofluorescenza può essere utilizzata per ricercare l'antigene della Bronchite Infettiva nel liquido allantoideo (nelle cellule sedimentate o in sezioni della membrana corio-allantoidea), nelle TOC o nelle colture cellulari, oppure esaminando sezioni o raschiati di trachea provenienti da soggetti infetti (De Wit, 2010). Dato che tale tecnica risulta essere poco sensibile, è necessario campionare gli animali nella fase iniziale, cioè entro 7 giorni dall'infezione, quando il virus è presente in quantità elevata. Per tale motivo i risultati negativi non sono una prova di assenza del virus e risulta indispensabile effettuare un ulteriore test per escludere la presenza di IBV (Cavanagh e Naqi, 2003).

Identificazione del genoma mediante tecniche di biologia molecolare: negli ultimi anni sono state messe a punto nuove tecniche di laboratorio che permettono di identificare il genotipo virale, sulla base della sequenza degli acidi nucleici che hanno soppiantato la VN e la HI per la diagnosi di IBV.

Tra queste la *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) è una tecnica che viene sempre più utilizzata, perché risulta essere rapida (i risultati sono pronti in circa 10 ore), economica e ha la capacità di identificare una grande varietà di genotipi; inoltre può essere effettuata, previa estrazione dell'RNA virale, da tessuti degli animali infetti (come tessuti renali o tracheali), da tamponi di animali vivi (come tamponi orofaringei, tracheali o cloacali anche lasciati asciugare all'aria e tenuti a temperatura ambiente), o dal liquido allantoideo delle uova inoculate per l'isolamento (Pascucci, 1998). Per tali ragioni la RT-PCR è un test utilizzato di *routine* che permette di testare numeri elevati di campioni. La prova si può applicare anche sul virus inattivato dal calore (a 56°C per 15 min) e ciò rende meno rischioso lo studio di ceppi provenienti da altri Paesi (De Wit, 2010).

Sono stati messi a punto differenti protocolli di RT-PCR con lo scopo di amplificare diverse porzioni dell'RNA virale ma solitamente vengono utilizzati quelli che amplificano l'intera regione codificante la proteina S o, più frequentemente, la sequenza nucleotidica della regione ipervariabile S1 (Jones *et al.*, 2011). Infatti, il sequenziamento di questi tratti genomici e la successiva comparazione con ceppi noti o con sequenze depositate in database pubblici permette la successiva caratterizzazione e genotipizzazione dei campioni positivi ad IBV (Acevedo *et al.*, 2013).

Ulteriori tecniche per caratterizzare i ceppi identificati sono la RT-PCR *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e l'ibridazione (De Wit, 2010). In particolare l'ibridazione utilizza delle sonde molecolari, cioè dei frammenti di DNA noto a singolo filamento che si legano ad una sequenza complementare; la sonda viene marcata con isotopi radioattivi o sostanze fluorescenti per renderla poi visibile. Questa tecnica è stata utilizzata in uno studio di Choulsalkar *et al.* (2009) per quantificare il genoma virale nell'ovidutto di animali vaccinati e animali non vaccinati e valutarne quindi la protezione indotta dal vaccino. Le sonde però vengono utilizzate molto raramente: per il loro costo elevato infatti non sono adatte a essere usate come tecnica di *routine*, anche se risultano essere molto accurate e affidabili.

La tecnica della RT-PCR RFLP è un tipo di PCR che può essere utilizzata per evidenziare ceppi ricombinanti o infezioni miste, grazie alla capacità del test di amplificare e frammentare l'amplificato utilizzando enzimi digestivi di restrizione; in questo modo è possibile distinguere genotipi/sierotipi virali differenti all'interno dello stesso campione (Gelb e Jackwood, 2008). Questa tecnica presenta risultati corrispondenti al test della virus neutralizzazione (Pascucci, 1998).

Un'altra tecnica molto utilizzata è la real time RT-PCR che è stato dimostrato avere lo stesso grado di sensibilità dell'isolamento virale e serve per aumentare la sensibilità della RT-PCR (Jones *et al.*, 2011). Il tempo di esecuzione del test risulta essere più rapido rispetto alla PCR classica, accurato e riproducibile (Fan *et al.*, 2012). Inoltre può essere utilizzata qualora si voglia quantificare l'espressione di un determinato gene, per esempio durante prove sperimentali.

Per aumentare la sensibilità della RT-PCR classica sono stati messi a punto protocolli di nested PCR (Cavanagh *et al.*, 1999) o di semi-nested PCR (Okino *et al.*, 2005), dove il DNA prodotto dalla prima PCR viene ulteriormente amplificato con una seconda PCR che utilizza una seconda coppia di *primer* entrambi, o solo uno, interni ai primi (De Wit, 2010). Questa tecnica però non viene utilizzata di *routine* per la sua estrema sensibilità e l'alto rischio di contaminazione durante la manipolazione del campione; il rischio di falsi positivi risulta quindi molto più elevato della tecnica classica (Cavanagh e Naqi, 2003).

Identificazione indiretta con metodi sierologici: se non è necessario isolare il virus su campioni animali, è possibile utilizzare metodi che ricercano nel siero gli anticorpi prodotti dal virus. Tra questi metodi i più utilizzati per IBV sono i seguenti:

- il test *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) è un metodo molto sensibile, veloce e semplice da usare (esistono dei *kit* commerciali), è in grado di rilevare la presenza di

anticorpi contro la BI già dalla prima settimana dopo l'infezione. Per la diagnosi vengono effettuate due prove, una su un campione di siero prelevato ai primi sintomi della malattia e una su un campione prelevato a una distanza di una settimana o più (Cavanagh e Naqi, 2003). Il test ELISA può essere utilizzato per differenziare tra IgG, IgM, IgA (in particolare le IgM sono prodotte molto presto durante l'infezione, quindi la loro presenza è indice di una infezione recente), serve per monitorare la risposta alle vaccinazioni o per uno *screening* del gruppo; non può però essere utilizzato per differenziare i vari ceppi virali, perché presenta una grande reattività crociata tra i diversi ceppi (Pascucci, 1998).

- la virus neutralizzazione (VN) è un test tipo-specifico che può essere utilizzato sulle uova embrionate, sulle culture cellulari e sulle TOC. Può essere condotto utilizzando due metodi: siero a quantità di diluizione costante e virus diluito a vari livelli (*alpha*), oppure siero diluito e virus costante (*beta*). Cowen e Hitchner in un suo studio del 1975, hanno utilizzato anche il metodo con siero costante e virus costante per tipizzare ceppi di IBV. Il metodo della VN viene utilizzato per differenziare sierotipi diversi. Spesso ci possono essere delle cross-reattività tra i differenti sierotipi, soprattutto quando viene utilizzato su sieri provenienti da broiler che sono stati vaccinati precedentemente contro IBV. Questo metodo può essere utilizzato su uova embrionate di pollo SPF o su TOC; non viene però utilizzato di *routine*, perché è laborioso e occorre quasi una settimana per ottenere i risultati (Cook, 2008).
- l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizza la proprietà del virus della Bronchite Infettiva di agglutinare i globuli rossi di pollo se viene trattato con fosfolipasi. Questo test è semplice e utilizzato di *routine*, però presenta una specificità minore dei precedenti test: vengono aggiunti anticorpi antiemoagglutinanti in una provetta assieme al siero da analizzare e se è presente il virus della Bronchite Infettiva ci sarà sedimentazione dei globuli rossi (Gelb e Jackwood, 2008).
- la precipitazione in gel di agar è un test gruppo-specifico semplice ma poco sensibile perché alcuni soggetti non sviluppano le precipitine (un tipo di anticorpi che, in determinate condizioni, determina la formazione di un precipitato proteico visibile, costituito da Ag e Ab) o queste sono presenti solo per poche settimane (Jordan, 1995). L'antigene è preparato da un omogenato di membrane corion-allantoidee di embrioni di pollo infetti (spesso usando il ceppo Beaudette, letale per gli embrioni).

6. CONTROLLO DELLA MALATTIA

6.1 RISPOSTA IMMUNITARIA

A causa dei diversi genotipi e ceppi della Bronchite Infettiva, sono presenti molte differenze nella risposta immunitaria a seguito di infezione o vaccinazione.

Durante il primo periodo di vita dell'animale, è presente una forte immunità passiva derivante dalla madre; questa immunità ha una durata di circa 7 giorni (Mondal e Naqi, 2001). Alti livelli di anticorpi passivi materni (IgG) riducono significativamente la gravità dei sintomi clinici e delle lesioni alla trachea, ai reni e all'ovidutto durante i primi giorni di vita dell'animale (De Wit *et al.*, 2011). Questo alto livello anticorpale però ha lo svantaggio di ridurre anche la risposta alla vaccinazione, di norma praticata nei primissimi giorni di vita (Cavanagh e Naqi, 2003).

Durante un'infezione o come risposta alla vaccinazione, la prima difesa prodotta dall'organismo è l'immunità locale costituita dalle IgA, che sono presenti a livello delle prime vie aeree e della trachea, e hanno il compito di limitare la diffusione del virus al resto dell'organismo e l'immunità cellulo-mediata (costituita da $IFN\gamma$ e cellule T).

Dopo un certo periodo di tempo la risposta adattativa, rappresentata dalle cellule B e T, si mobilita e inizia a produrre anticorpi specifici contro IBV. Questi vengono ritrovati, tra 1 e 2 settimane post-infezione, nelle lacrime (dove sono presenti IgA prodotte soprattutto dalle ghiandole di Harder e IgG per trasposto passivo dal siero, oltre a qualche IgM) e nel siero (con IgG, IgM e IgA) (Cavanagh e Naqi, 2003). In particolare le IgG si rilevano nelle lacrime da 5 giorni p.i. e il loro livello è direttamente proporzionale alla dose vaccinale o virale infettante, mentre la presenza di IgA e IgM non sembra proporzionalmente correlata a questi fattori (Okino *et al.*, 2013).

Gli animali esposti al virus producono anticorpi in circa 3 settimane e questi sono riscontrabili fino a un anno o anche più, per cui l'animale è immune alla Bronchite Infettiva fino a 12 mesi (Hofstad, 1965). Ci sono però opinioni contrastanti riguardo il periodo di immunità dell'animale: alcuni autori affermano infatti che la difesa contro la malattia diminuisce con il tempo e l'animale può reinfettarsi molto prima di un anno (Van Roeckel *et al.*, 1950).

Somministrare anticorpi passivi tramite il siero, invece, sembra non essere efficace per proteggere l'animale dalla malattia naturale (Hofstad e Kenzy, 1950).

6.2 PREVENZIONE DELLA MALATTIA

Poiché non sono presenti specifici trattamenti per la Bronchite Infettiva, l'unico metodo per evitare l'infezione sono le classiche misure di biosicurezza e le buone pratiche di allevamento (adeguata temperatura e ventilazione), per ridurre la predisposizione degli animali all'infezione e gli eventuali sintomi clinici. Per evitare l'irruzione di possibili infezioni batteriche secondarie vengono utilizzati trattamenti antimicrobici.

6.3 CONTROLLO DELLA MALATTIA

Dal momento che è impossibile eliminare il virus della Bronchite Infettiva, perché ubiquitario e caratterizzato da rapida diffusione tra allevamenti vicini, l'unico modo per controllare l'infezione consiste nell'aumentare la resistenza dell'animale contro il virus, per mezzo della vaccinazione.

Per indurre la formazione di anticorpi neutralizzanti, i vaccini devono contenere gli stessi epitopi della glicoproteina S contenuti nel virus circolante nell'area dove si vuole attuare il piano di vaccinazione, in modo da produrre inizialmente un'immunità locale nelle prime vie respiratorie specifica per quel genotipo virale e poi permettere la produzione di anticorpi specifici.

Il primo vaccino contro IBV fu prodotto negli Stati Uniti utilizzando il ceppo Massachusetts (M41) che è stato isolato nell'università del Massachusetts, Amerst, nel 1941; questo vaccino venne poi utilizzato anche in altri laboratori e divenne l'antenato del vaccino usato tuttora in America. Il vaccino M41 venne creato tramite 25 o più passaggi del virus in uova embrionate, in modo da diminuirne la patogenicità e la capacità di diffusione (Hofstad, 1965).

Attualmente per la Bronchite Infettiva sono disponibili sia vaccini vivi sia vaccini spenti: entrambi si sono dimostrati efficaci, ma, secondo Jordan (1995), per avere la massima protezione l'animale, sia riproduttore che ovaio, dovrebbe essere inoculato una prima volta con un vaccino vivo e dopo almeno 8 settimane, per evitare interferenze, con uno spento.

La somministrazione dei vaccini può avvenire in vari modi: direttamente *in ovo* negli incubatoi; nei pulcini per inoculazione oculare (con gocce) o nasale, o con il metodo spray in incubatoio o in allevamento; nei polli adulti il vaccino viene invece somministrato nell'acqua di bevanda o con l'aerosol (in animali che hanno già un certo grado di protezione in modo da evitare conseguenze per la possibile penetrazione del virus nei polmoni), oppure per quanto

riguarda i vaccini spenti con iniezioni a livello intramuscolare (su petto o coscia) o sottocutaneo (Cook, 2008).

I vaccini utilizzati per la Bronchite Infettiva sono sia vaccini vivi, come detto in precedenza, sia vaccini spenti, con le seguenti indicazioni:

- i vaccini vivi vengono utilizzati nei broiler e come prima vaccinazione nei riproduttori e nelle galline ovaiole, sono spesso attenuati tramite passaggi seriali in uova embrionate per diminuirne la patogenicità. Questi vaccini stimolano fortemente l'immunità locale e cellulo-mediata (Okino *et al.*, 2008), ma hanno lo svantaggio di una possibile rivirulentazione nel corso dell'uso, di possibili mutazioni e ricombinazioni genomiche e possono causare infezioni latenti;
- i vaccini spenti vengono invece utilizzati nelle vaccinazioni successive alla prima nei riproduttori e nelle ovaiole, sono mantenuti in un'emulsione oleosa e il virus viene inattivato grazie alla formalina, al beta-propiolattone o ai raggi ultravioletti (Hofstad, 1965); al contrario questi vaccini sono più sicuri di quelli vivi, ma danno una scarsa immunità cellulare.

Teoricamente i vaccini dovrebbero contenere i sierotipi/genotipi virali che circolano nella zona o all'interno dell'allevamento dove vengono utilizzati, però attualmente il sierotipo M41 è utilizzato in tutti i paesi del mondo, perché rappresenta il genotipo più diffuso al mondo e anche quello isolato per primo.

In Europa viene utilizzato di solito il ceppo H120, al quale si aggiunge quello presente nella zona di destinazione (come i ceppi D274, D1466 e 793B); si utilizza l'associazione tra due vaccini e non il vaccino singolo, perché si è valutato in vari studi che questo aumenta molto la protezione contro i diversi genotipi virali circolanti.

Ad esempio, la protezione indotta dal vaccino H120 in associazione al vaccino 793B è stata studiata da Malo *et al.* (1998) in polli SPF. Gli animali sono stati vaccinati a 1 giorno di vita con H120 e a 14 giorni con 793B, dividendoli in vari gruppi in base alla modalità di vaccinazione scelta: con entrambi i vaccini o singolarmente. Si è poi misurata l'attività di ciliostasi nella trachea a 5 settimane di età a seguito di infezione sperimentale. Si è determinato che la protezione contro vari genotipi virali indotta dai due vaccini associati è molto maggiore rispetto alla protezione data dai vaccini utilizzati singolarmente.

Il vaccino contro la Bronchite Infettiva è spesso utilizzato in associazione a quello contro la malattia di Newcastle, per motivi di convenienza e perché non sembra che tra i due insorgano interferenze nella risposta immunitaria di entrambi (Markham *et al.*, 1956; Winterfield, 1984).

6.4 VACCINI ATTUALMENTE IN USO

Come suggerito da Pascucci (2013), esistono vari schemi vaccinali sia per i broiler, sia per le galline ovaiole.

In generale però, il piano vaccinale del broiler consiste essenzialmente in una vaccinazione spray in incubatoio con il vaccino vivo H120 e la rivaccinazione singola o ripetuta con uno tra i seguenti ceppi vaccinali: 4/91, 793B, CR88, IBV 1/96 in acqua da bere (chiamati anche in generale variante inglese, Tab. 4). Lo scopo principale della vaccinazione nei polli da carne è quello di prevenire la forma respiratoria della malattia e le possibili complicanze, come la frequente Colisetticemia e in qualche caso la nefrite-nefrosi.

Tabella 4 Schemi vaccinali per la Bronchite Infettiva per broiler (modificato da Pascucci, 2013)

Età e via di infezione	Schema 1	Schema 2	Schema 3
0 gg spray in incubatoio	H120	H120	H120 + D274
10 gg idro	var. inglese		
15-18 gg idro		var. inglese	
30 gg idro	var. inglese		

Per le pollastre viene sempre utilizzato il ceppo H120 in incubatoio e la variante inglese, effettuata a vari intervalli secondo schemi diversi, quasi sempre in acqua da bere; importante è la vaccinazione con vaccino spento M41 prima dell'entrata in deposizione. Per le ovaiole la vaccinazione ha lo scopo di proteggere, oltre all'apparato respiratorio e renale, anche l'apparato riproduttivo per prevenire il calo dell'ovodeposizione (Tab. 5).

Tabella 5 Schemi vaccinali per la Bronchite Infettiva per pollastre (modificato da Pascucci, 2013)

Età e via di vaccinazione	Schema 1	Schema 2	Schema 3
0 gg spray in incubatoio	H120 + D274	M41 clonato	H120
1 gg spray			var. inglese
7 gg idro	var. inglese		
15 gg idro		var. inglese	
35 gg idro/parenterale		var. inglese	M41 spento
40 gg parenterale	M41 spento		
60 gg idro	var. inglese		var. inglese
65 gg idro		var. inglese	
111/116 gg parenterale	M41 spento	M41 spento	M41 spento

Da maggio 2013, gradualmente in alcuni allevamenti avicoli di broiler si è deciso di provare ad utilizzare solamente la prima vaccinazione con H120 in incubatoio e di eliminare la seconda vaccinazione con variante inglese e le eventuali vaccinazioni seguenti. Inoltre, in alcune realtà sta prendendo piede la vaccinazione a 1 giorno di vita con il vaccino H120 abbinato al ceppo IBV 1/96 genotipo 793B.

6.5 VACCINO CONTRO IL GENOTIPO QX

Da qualche mese in Italia è disponibile in commercio il vaccino omologo contro il genotipo QX della Bronchite Infettiva, già utilizzato in alcuni paesi europei.

Uno studio di Geerligts *et al.* (2011) descrive l'efficacia del vaccino vivo attenuato prodotto dal ceppo L1148 QX-like. Il vaccino è stato attenuato tramite vari passaggi in uova embrionale di pollo SPF e molte prove sono state eseguite in polli di 1 giorno di età per testarne la sicurezza nei confronti dell'apparato renale e respiratorio; in particolare nel test della ciliostasi è stata considerata normale un'attività per cui almeno il 50% delle ciglia mostrava un movimento vigoroso e un pollo si è ritenuto protetto quando almeno 9 su 10 anelli tracheali erano normali. Il passaggio numero 80 è stato valutato in termini di sicurezza per l'apparato riproduttore e si è notato che in una piccola percentuale di galline c'erano lesioni macroscopiche come ovidotti cistici, soprattutto nella porzione media, e aplasia del segmento superiore, che però scomparivano con l'aumentare dei passaggi di attenuazione. Secondo gli autori questo vaccino è efficace per proteggere gli animali contro il genotipo QX, anche se l'interazione e la compatibilità con altri vaccini non è ancora stata studiata.

In Italia si vaccinano gli animali utilizzando vaccini che proteggono contro altri genotipi di IBV, cioè il vaccino tipo-Massachusetts H120 e la variante inglese (come spiegato nel paragrafo precedente), sfruttando la loro cross-reattività.

La validità di questa associazione è stata verificata in diversi studi.

Nel lavoro di Terregino *et al.* (2008) è stato dimostrato che la vaccinazione combinata utilizzando il ceppo Mass5 in pulcini di un giorno d'età e il vaccino 4/91 a 14 giorni di vita induce un alto livello di protezione contro il genotipo QX: la vaccinazione riduce e alcune volte previene la replicazione del virus nel tratto respiratorio, ma non nel rene e nell'ovaio/ovidutto, anche se riduce comunque le lesioni a questi tratti.

In uno studio del 2010, inoltre, Massi *et al.* hanno vaccinato 50 polli femmine a un giorno di vita per via oculo-congiuntivale con un vaccino vivo bivalente contenente il ceppo tipo-Massachusetts H120 e la variante Olandese D274. Gli animali, suddivisi in 5 gruppi,

sono poi stati infettati a 30 giorni di età con i genotipi Italy 02, 793B e QX. Grazie a vari prelievi sierologici sono stati verificati i livelli anticorpali contro i vari genotipi e grazie all'esame della ciliostasi nelle trachee di alcuni animali per ogni gruppo è stato possibile valutare il livello di protezione. Lo studio ha messo in evidenza che il vaccino bivalente dà un buon livello di protezione contro i 3 genotipi presi in considerazione, amplifica la stimolazione antigenica e prolunga la stimolazione immunitaria.

D'altra parte, come si legge da uno studio di Sun *et al.* (2011), la protezione indotta dal sierotipo Massachusetts H120 utilizzato singolarmente contro il genotipo QX è povera e solo parziale: infatti alcuni dei polli vaccinati nell'esperimento presentavano sintomi clinici, anche se la mortalità tra gli animali vaccinati era quasi nulla. In tutti gli animali vaccinati è stato re-isolato il virus sia in trachea che nei reni; inoltre 15 giorni p.i. tutti i polli vaccinati con H120 hanno sierconvertito, questo fa supporre che il vaccino utilizzato da solo non dia protezione contro l'invasione virale dell'apparato respiratorio e renale.

7. MATERIALI E METODI

7.1 CAMPIONI

Durante l'attività diagnostica e di ricerca svolta presso il dipartimento MAPS sono stati identificati 154 campioni positivi ad IBV di cui 73 campioni positivi al virus della Bronchite Infettiva, precedentemente caratterizzati come appartenenti al genotipo QX.

I campioni sono stati prelevati da Gennaio 2012 a Giugno 2014, da 60 allevamenti di polli da carne dislocati nel Nord Italia e da 2 aziende di Benevento (Tab. 6).

Tabella 6 *Distribuzione dei campioni secondo la provincia dell'azienda campionata e numero di campioni per provincia*

PROVINCIA	N° AZIENDE PER PROVINCIA	N° CAMPIONI PER PROVINCIA
Benevento	2	2
Brescia	3	4
Cremona	2	2
Mantova	1	1
Padova	4	4
Pordenone	1	1
Verona	45	55
Vicenza	4	4
TOT	62	73

Ad ogni azienda è stato assegnato un numero progressivo al momento dell'arrivo in laboratorio; ai campioni invece, oltre al numero identificativo al momento del campionamento, è stata aggiunta anche la provincia dell'allevamento, il numero progressivo dell'azienda e la data di raccolta.

La maggior parte dei campioni consisteva in tamponi tracheali, 2 erano dei tamponi prelevati dalla lettiera e 4 provenivano dai tessuti renali di animali morti.

Da questi sono state prelevate aliquote di 200 µL per l'estrazione dell'RNA: la procedura di estrazione è stata eseguita utilizzando *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostic, Monza, Italia), seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Dopo la raccolta, prima della fase di amplificazione e dopo di questa i campioni sono stati conservati a -80 °C.

7.2 DATABASE

Per catalogare i campioni, le varie analisi eseguite e i risultati ottenuti è stato creato un archivio in Microsoft® Excel® 2010 con varie informazioni:

- Numero identificativo del campione,
- Data di campionamento,
- Età del gruppo da cui è stato prelevato il campione,
- Località dell'azienda di provenienza,
- Nome dell'azienda di provenienza,
- Provincia dell'azienda,
- Numero progressivo dell'azienda,
- Indirizzo dell'azienda,
- Latitudine dell'azienda,
- Longitudine dell'azienda,
- Numero identificativo del ciclo produttivo,
- Tipo di campione prelevato,
- Scopo del campionamento,
- Sintomatologia e lesioni,
- Altre positività (inteso come altri patogeni identificati).

7.3 SEQUENZIAMENTO REGIONE IPERVARIABILE DELLA PROTEINA S1

Una indagine preliminare sulla diffusione dei genotipi circolanti in Italia è stata eseguita sequenziando la regione ipervariabile (H3) della proteina S1. A partire dal protocollo descritto da Worthington *et al.* (2008), sono state apportate alcune modifiche al fine di ottimizzare la resa di reazione e la sensibilità del metodo. La regione di interesse è stata amplificata utilizzando il kit *SuperScript®III Platinum®One-Step RT-PCR System* (Life Technologies, Monza, Italia). Ad una *mix* di reazione standard comprendente il *buffer* di reazione, 0.4 mM di ogni dNTP, 2.4 mM di MgSO₄, 0.5 μM di *primer* SX2- e SX3+ (Tab. 7) e 0.5 μL di *mix* di enzimi contenente *SuperscriptIII®* e *Platinum Taq polymerase®* sono stati addizionati 5 μL di RNA. Il volume finale è stato aggiustato a 25 μL addizionando acqua *nuclease free*.

Il protocollo termico prevedeva una prima fase di RT a 50°C per 30 min seguita dall'inattivazione dell'RT/attivazione della DNA polimerasi ottenuta innalzando la temperatura a 94°C per 2 min. Seguivano 45 cicli di PCR comprendenti 30 sec a 94°C, 20 sec a 50°C e 40 sec a 72°C. Al termine dell'ultimo ciclo è stata prevista una elongazione finale a 72°C per 2 min.

7.4 DISEGNO DEI PRIMER PER L'AMPLIFICAZIONE E IL SEQUENZIAMENTO DELL'INTERA REGIONE S1

Al fine di amplificare e successivamente sequenziare l'intera regione S1, sono state disegnate diverse coppie di *primer* utilizzando il programma *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Particolare attenzione è stata riservata alla scelta della dimensione degli amplificati, per poter garantire contestualmente un'elevata efficienza di reazione di PCR e la sequenziabilità con il metodo *Sanger*.

Per ciascun segmento è stata inoltre prevista una sovrapposizione con quelli adiacenti di almeno 200 bp, che permettesse un'agevole concatenazione degli stessi.

Sono state quindi disegnate delle coppie di *primer* che consentissero di sequenziare la sub-unità S1 in 2 segmenti di lunghezza compresa fra 1100 e 1300 bp. Per uniformare, per quanto possibile, i successivi protocolli di PCR, si è cercato di ottenere oligonucleotidi che presentassero analoghe caratteristiche chimiche e termodinamiche. La presenza di omo ed eterodimeri nelle diverse coppie di *primer* è stata valutata *in silico* utilizzando il programma *OligoAnalyzer 3.1* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

Le successive prove sperimentali hanno permesso di selezionare, sulla base del confronto fra la concentrazione e la specificità dell'amplificato ottenuto, le due coppie di *primer* che sono state utilizzate nello svolgimento della tesi (Tab. 7).

Tabella 7 Sequenza nucleotidica e PCR dei primer utilizzati

NOME PRIMER	SEQUENZA (5'-3')	PCR
SX2-	TCCACCTCTATAAACACC C/T TT	Regione ipervariabile S1
SX3+	TAATACTGG C/T AATTTTTCAGA	Regione ipervariabile S1
seq F2	TGGGTGACAGTGGAAACTG	S1 – PCR 1
SX4-	AATACAGATTGCTTACAACCACC	S1 – PCR 1
SX3+	TAATACTGG C/T AATTTTTCAGA	S1 – PCR 2
seq R	TGTGTTTGTATGTACTCATC	S1 – PCR 2

7.5 PROTOCOLLO PCR E VALIDAZIONE

La fase iniziale dell'analisi dei campioni tramite la PCR ha avuto la finalità di validare il protocollo da utilizzare in seguito.

Sono state effettuate alcune prove, variando sia il protocollo termico, sia la concentrazione dei vari reagenti, in modo da mettere a punto un metodo che meglio rispondesse alle esigenze specifiche dei campioni e delle analisi da effettuare.

Alla fine si è scelto un protocollo termico in due fasi:

1. La fase di retrotrascrizione (RT) è stata effettuata utilizzando il *kit Maxima H Minus Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific, Milano, Italia). 5 µL di RNA sono stati addizionati ad una pre-mix contenente 20 pmol di *primer SeqS1R* (Tab. 7) e dNTPs (concentrazione finale 0.5 mM). Il volume finale è portato a 14.5 µL addizionando acqua *nuclease free*.

Al fine di denaturare potenziali strutture secondarie dell'RNA, frequenti nei virus a RNA, è stato eseguito uno *step* preliminare di denaturazione a 65° per 5 min.

Si è quindi proceduto all'aggiunta di un *mix* contenente il *buffer* di reazione, *Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor* (20 U) e *Maxima H Minus Reverse Transcriptase* (60 U). La reazione di retro-trascrizione è stata eseguita a 50°C per 60 min e terminata incrementando la temperatura a 85°C per 5 min.

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato immediatamente per la PCR o conservato a -20°C sino all'utilizzo.

2. Per la PCR si è scelto di utilizzare il kit *Platinum[®] Taq DNA polymerase* (Life Technologies Corporation, Monza, Italia), con *mix* di reazione costituita da *IX PCR Buffer Minus Mg*, 0.2 mM di ciascun *nucleotide trifosfato*, 1.5 mM di *MgCl₂*, 0.5 μM di ciascun *primer* (Tab. 7), 1U di *Platinum[®] Taq DNA polymerase* e 5 μL di cDNA.

Il protocollo termico selezionato prevedeva una prima fase di incubazione a 95 °C per 2 min; poi 45 cicli composti da rispettivamente una fase di denaturazione del DNA (con scissione delle due eliche) a 95°C per 20 sec, una fase di *annealing* “*touchdown*” a partire da 55°C con decremento della temperatura di 0.5°C ad ogni ciclo fino ad raggiungimento della temperatura finale di 50°C, infine una fase di estensione a 72°C per 1 min e 15 sec; alle precedenti segue una fase unica di elongazione finale a 72°C per 5 min.

Le reazioni di RT e amplificazione sono state effettuate con il termociclatore *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems[®]). Poiché i campioni erano sicuramente positivi, si è aggiunto solamente il bianco per il controllo.

Qualora il quantitativo di DNA, valutato tramite elettroforesi su gel di agarosio, fosse insufficiente ai fini del sequenziamento, data la disponibilità per ogni segmento di *primer* appositi per il sequenziamento disegnati internamente ai primer *forward*, sono state eseguite anche reazioni di *eminested* PCR sugli amplificati primari, utilizzando per la prima PCR la coppia costituita da *primer* da sequenziamento F2 e R, mentre per la seconda sono state utilizzate le coppie di *primer* F2-SX4 e SX3-R. Lo stesso *kit* e i medesimi protocolli termici sono stati utilizzati per ambedue i segmenti.

7.6 ELETTROFORESI

I prodotti di PCR sono stati caricati con addensante *6X DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), su gel di agarosio 2% addizionato con *EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution* (EuroClone S.p.A., Milano, Italia) e sottoposti ad una differenza di potenziale costante di 100V per 40 minuti, in *buffer TBE IX*.

Dopo la corsa elettroforetica le bande sono state esaminate con il transilluminatore *Gel Doc XR System* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Hercules, California, America). La lunghezza e le caratteristiche di ogni amplificato sono state comparate con un amplificato standard a peso molecolare e concentrazione noti che è stato caricato su gel assieme ai campioni, il *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia).

Se erano presenti prodotti aspecifici, i purificati venivano sottoposti a corsa elettroforetica prolungata per distanziare maggiormente le bande e poter poi purificare il campione da gel, prelevando la banda di interesse.

7.7 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR E SEQUENZIAMENTO

Gli amplificati ottenuti sono stati ulteriormente purificati per eliminare *primer*, sali, nucleotidi ed enzimi che residuavano dalla reazione di PCR e che avrebbero potuto creare problemi alle fasi successive. Per questa fase è stato utilizzato il kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germania), seguendo le istruzioni fornite dalla Ditta Produttrice e impiegato sia per i campioni prodotti con la PCR, sia per quelli prelevati da gel.

I purificati sono stati poi contrassegnati e mantenuti a -20°C, fino alla spedizione a *Macrogen Europe* per il sequenziamento tramite metodo *Sanger*. In particolare, di ciascun amplicone sono stati sequenziati ambedue i filamenti (*forward* e *reverse*) utilizzando i medesimi *primer* impiegati per la PCR.

7.8 ANALISI DELLE SEQUENZE

Le sequenze, in *forward* e *reverse*, sono state dapprima assemblate e sovrapposte con il software *ChromasPro v1.45* (Technelysium Pty Ltd.), le sequenze così ottenute sono state poi cercate in BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Le sequenze definitive sono state copiate in un file Word® temporaneo, per essere ulteriormente analizzate.

7.9 ANALISI BIOINFORMATICHE

Sia le sequenze parziali che quelle complete dell'S1 sono state allineate con il software *MEGA6 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0* (Tamura *et al.*, 2013). Le sequenze ottenute in questo studio sono state allineate alle sequenze di riferimento dei principali genotipi di IBV utilizzando il metodo MUSCLE, implementato in MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Per evidenziare la presenza di *marker* vaccinali utili a discriminare ceppi di campo italiani da ceppi di origine vaccinale, sono stati inclusi nel database anche la sequenza del vaccino basato sul genotipo QX (dedotta da Geerlings *et al.*, 2011) registrato in Italia e del suo ceppo progenitore (ceppo L-1148A, accession number *GenBank* DQ341199)

(Geerlings *et al.*, 2011). Nel caso delle sequenze codificanti per l'S1, al fine di rispettare la natura codificante della regione, esse sono state allineate fra loro a livello amminoacidico e, successivamente, è stata sovrainposta la corrispondente sequenza nucleotidica.

L'analisi della ricombinazione è stata eseguita utilizzando i metodi RDP, GENECONV, *MaxChi*, *Bootscan* e *3Seq* presenti nel programma RDP3 (Martin *et al.*, 2010). I parametri di analisi di ciascun metodo sono stati configurati in funzione delle caratteristiche del database, secondo quanto suggerito dal manuale del *software* stesso. Al fine di ottenere una stima conservativa degli eventi di ricombinazione, questi sono stati accettati qualora fossero rilevati, da più di 2 metodi, con un livello di significatività statistica di $p < 0.01$, assumendo la correzione di Bonferroni per confronti multipli.

Utilizzando il database costituito da tutte le sequenze parziali, è stata eseguita una ricostruzione filogografica della diffusione di IBV. In particolare, implementando un modello statistico di tipo Bayesiano, sviluppato da Lemey *et al.* (2010) e basato sulla teoria della "Coalescente", è stato possibile co-estimare non solo l'areale di distribuzione geografica di IBV nel tempo, ma anche il tasso di sostituzione nucleotidica e la collocazione temporale dell'antenato comune degli stipiti da noi campionati (MCRA-*Most Recent Common Ancestor*).

Gli alberi filogenetici sono stati ricostruiti a partire da questi allineamenti utilizzando un approccio di *Maximum Likelihood* avvalendosi del software PHYML (Guindon *et al.*, 2010). La robustezza della topologia ottenuta è stata valutata utilizzando il *Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood ratio test* (SH-aLRT) (Anisimova *et al.*, 2011). Il modello di sostituzione nucleotidica più adeguato al database utilizzato è stato selezionato considerando i risultati del *Akaike's information criterion* (AIC) calcolato utilizzando *Jmodeltest 2.1.2* (Darriba *et al.*, 2012). La distanza genica fra i diversi stipiti identificati nello studio è stata calcolata utilizzando il programma MEGA6. Similmente è stata valutata la percentuale di identità fra i ceppi italiani e quello vaccinale.

Sul database costituito dalle sole sequenze italiane, sono stati calcolati con *BioEdit* (Hall, 1999) i valori di Entropia di *Shannon* E (H) per ciascuna posizione nucleotidica e amminoacidica della proteina S1. Brevemente, i valori di entropia danno un'indicazione della variabilità caratteristica di ciascuna posizione dell'allineamento relativamente ad altre. Ciò rende possibile valutare le regioni maggiormente variabili di ciascun gene e confrontare la variabilità nucleotidica con quella amminoacidica, fornendo una prima panoramica sulla possibile azione delle forze evolutive nel condizionare l'evoluzione virale.

L'azione della pressione selettiva nei diversi siti è stata studiata utilizzando un più robusto approccio matematico, stimando con dei metodi di *Maximum Likelihood* e di inferenza bayesiana il rapporto fra il tasso di sostituzione non-sinonimo (dN) e il tasso di sostituzione sinonimo (dS).

Se si assume che la selezione agisca in modo meno intenso nei confronti delle mutazioni silenti, l'analisi del tasso di sostituzione sinonimo e non-sinonimo dovrebbe riflettere l'azione della selezione stessa. Un $dN/dS > 1$ (o similmente un $dN-dS > 0$) suggerisce la presenza di una pressione selettiva diversificante, favorente la variabilità amminoacidica in quel sito. Similmente valori di dN/dS inferiori a 1 sono indicativi di una pressione selettiva purificante, indicativa dell'effetto svantaggioso sulla *fitness* virale di mutazioni amminoacidiche (comportanti diverse caratteristiche fisico-chimiche) in un particolare sito.

Per massimizzare le informazioni ottenibili sono stati utilizzati diversi metodi, inclusi nel programma HYPHY (Pond *et al.*, 2005), per la stima dei siti sottoposti a pressione selettiva diversificante/purificante di tipo pervasivo (SLAC, REL, FUBAR).

8. RISULTATI E DISCUSSIONE

8.1 VALIDAZIONE PROTOCOLLO

Per la PCR sono state effettuate alcune prove variando il profilo termico, la concentrazione e il tipo di reagenti come descritto nel capitolo precedente, in modo da validare un protocollo che rispondesse alle esigenze specifiche dei campioni e delle analisi da effettuare.

Si è scelto un protocollo termico in due fasi: una prima fase di retro-trascrizione (RT) (Tab. 8) e una seconda fase di PCR (Tab. 9).

Tabella 8 *Protocollo termico di retro-trascrizione (RT)*

RT	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione	65°C	5 min
Retro-trascrizione	50°C	60 min
Inattivazione RT	85°C	5 min

Tabella 9 *Protocollo termico di PCR*

PCR	TEMPERATURA	TEMPO	
Attivazione	95°C	2 min	
Denaturazione del DNA	95°C	20 sec	
Anneling “touchdown”	55°C	fino a 50°C	45 cicli
	decremento di 0.5°C		
	50°C		
Estensione	72°C	1 min 15 sec	
Elongazione finale	72°C	5 min	

Durante la fase di validazione, le prime corse elettroforetiche hanno aiutato nell'individuazione delle varie problematiche causate da tempi o temperature di reazione non adeguate (Fig. 15 e Fig. 16); la presenza di bande aspecifiche è stata poi risolta utilizzando il protocollo in due fasi descritto precedentemente.

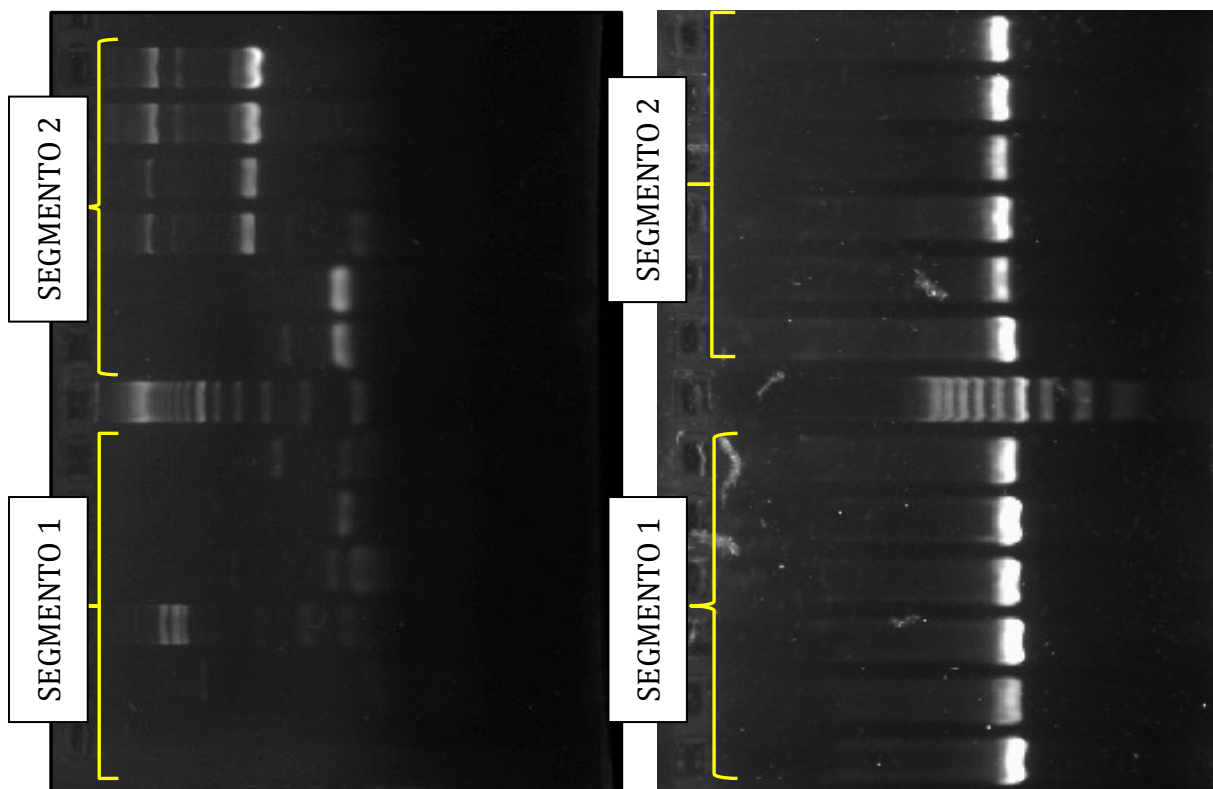


Figura 15 Primi risultati durante la fase di valutazione del protocollo di PCR. Il segmento 1 è stato ottenuto utilizzando i primer seq.F2 e SX4-; il segmento 2 utilizzando i primer SX3+ e seq.R

Figura 16 Risultati ottenuti con i protocolli definitivi. Il segmento 1 è stato ottenuto utilizzando i primer seq.F2 e SX4-; il segmento 2 utilizzando i primer SX3+ e seq.R

8.2 ANALISI DELLE SEQUENZE

8.2.1 Classificazione delle sequenze in esame

8.2.1.1 Analisi dei ceppi ricombinanti

La caratterizzazione delle sequenze ottenute è stata effettuata tramite il confronto con sequenze di riferimento depositate in *GenBank*.

Sono state analizzate 69 sequenze a livello della regione ipervariabile S1, mentre per 17 ceppi la classificazione è stata eseguita mediante l'analisi dell'intera sequenza del gene S1.

Grazie a successive analisi sono stati identificati due distinti eventi di ricombinazione (sequenze 25088 e 24150), aventi come stipiti parentali virus appartenenti ai genotipi QX e 793B (Fig. 17 e Fig. 18).

Per la sequenza 25088 il segmento ricombinante originato dal genotipo 793B interessava la regione dell'S1 compresa fra il nucleotide 868 e il nucleotide 1045, mentre per il campione 24150 il segmento QX era compreso tra i nucleotidi 779 e 898, mentre il genotipo 793B si trovava ai due estremi. Queste sequenze ricombinanti possono creare dei problemi per la

classificazione eziologica dei campioni, in quanto è difficile caratterizzarli come appartenenti specificatamente a uno dei due genotipi ritrovati. In aggiunta, la presenza di fenomeni di ricombinazione comporta una violazione degli assunti di alcune delle metodiche statistiche implementate in questo studio, per cui sono stati esclusi dalle successive analisi.

La presenza di fenomeni di ricombinazione in ceppi di IBV è nota e riportata in bibliografia. Chen *et al.* (2009) hanno sequenziato vari ceppi appartenenti al genotipo QX, evidenziando eventi ricombinanti in ceppi campionati in Taiwan, prodotti da sequenze parentali di ceppi di Taiwan con sequenze di ceppi parentali cinesi. Sono stati anche trovati due ricombinanti in Corea (Mo *et al.* 2013), uno con un tratto di sequenza del genotipo New cluster 1 e del genotipo QX e l'altro con un tratto di vaccino H120 e un tratto di genotipo K-I.

Da notare che in uno studio di Moreno *et al.* (2014) sono stati esaminati vari campioni prelevati nelle province di Verona, Brescia e Forlì-Cesena dal 2012 al 2014. In alcuni di questi è stato identificato un ceppo di IBV responsabile della sintomatologia respiratoria osservata. L'analisi delle sequenze del gene S1 di tali ceppi ha permesso di evidenziare un evento di ricombinazione caratterizzato nella parte iniziale e finale da sequenze con omologia elevata con il genotipo QX e nella parte centrale con il genotipo 793B. Uno di questi ceppi ha mostrato lo stesso evento di ricombinazione presente nel campione 25088 del presente studio (campionato a Castelnuovo del Garda, in provincia di Verona).

Moreno *et al.* hanno classificato questa variante come un nuovo genotipo correlato al ceppo IBV/Guandong/Xindadi/0903 proveniente dalla Cina. Tuttavia si è evidenziato in questo studio che la porzione iniziale e finale QX presenta omologia del 100% con un altro campione identificato nella stessa area geografica, mentre la porzione centrale ha un'elevata omologia con un vaccino attualmente commercializzato in Italia e basato su un ceppo genotipo 793B (98.3%, corrispondenti a 3 mutazioni). Questi dati fanno supporre che tale ceppo ricombinante non sia da classificare come un ceppo cinese, ma sia frutto di un evento di ricombinazione avvenuto in Italia, molto probabilmente nella zona di Verona, e che tale ceppo stia circolando negli allevamenti avicoli di quella zona.

Sarebbe interessante in studi futuri valutare se questi ceppi ricombinanti possano diffondersi nel territorio e creare problemi sanitari negli allevamenti di broiler e gallina ovaia in Italia oppure, al contrario, non avere capacità di endemizzarsi e quindi scomparire dal territorio, come avvenuto per i genotipi Italy 02 o 624/I.

Da sottolineare l'importanza, per una corretta classificazione di ceppi di IBV, di analisi preliminari volte a identificare fenomeni di ricombinazione non evidenziabili con il semplice confronto diretto delle sequenze in BLAST.

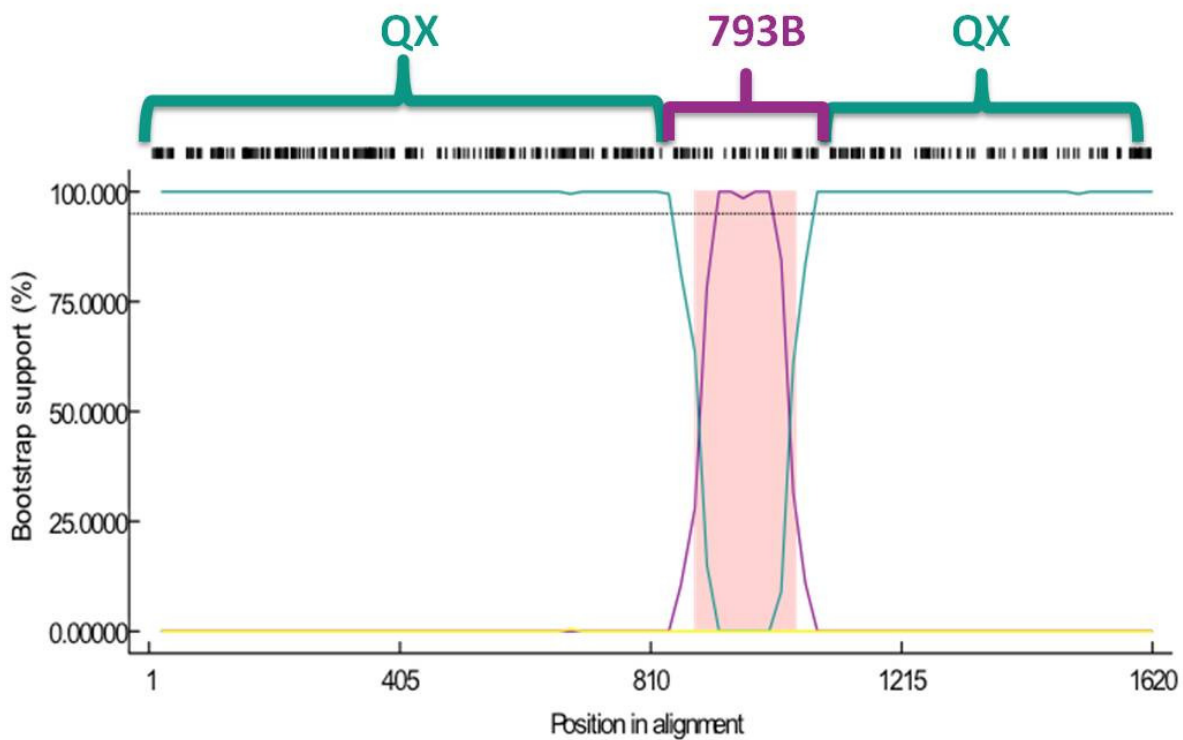


Figura 17 Rappresentazione grafica dell'evento di ricombinazione identificato nel campione 25088, con riportate la posizione nucleotidica di inizio e fine breakpoint

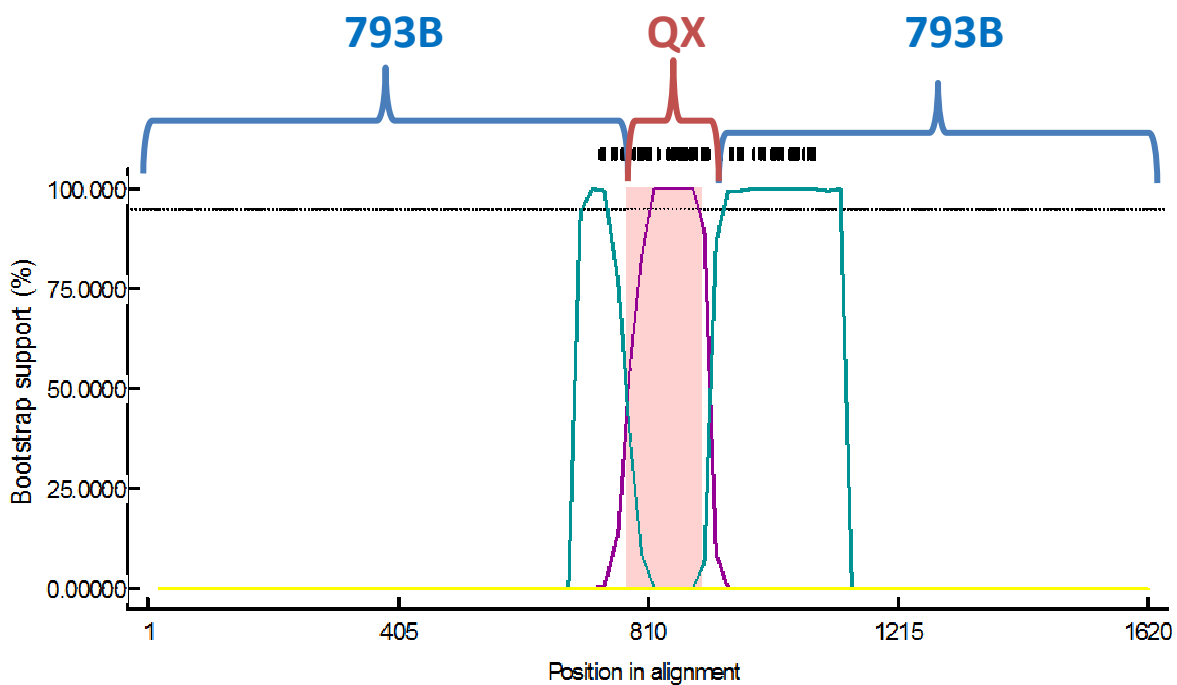


Figura 18 Rappresentazione grafica dell'evento di ricombinazione identificato nel campione 24150, con riportate la posizione nucleotidica di inizio e fine breakpoint

8.2.1.2 Differenze genomiche tra vaccino QX, progenitore del vaccino e ceppi italiani

Per poter effettuare un'indagine epidemiologica corretta e valutare il reale impatto dei ceppi di campo di Bronchite Infettiva aviaria in un territorio, sarebbe fondamentale avere a disposizione dei *marker* vaccinali che permettano di classificare in modo rapido e sicuro un campione come appartenente al virus di campo o al ceppo vaccinale. Tale distinzione non appare sempre facile, a causa della mancata disponibilità delle sequenze dei progenitori dei vaccini attualmente utilizzati in Europa o alla mancanza di sequenze di ceppi identificati prima dell'introduzione della vaccinazione con ceppi omologhi.

Infatti, finora le indagini sulla distribuzione del 793B sono state sovrastimate, poiché venivano considerati campioni positivi anche i campioni di origine vaccinale, come anche suggerito da uno studio di Worthington *et al.* (2008).

Uno studio di Franzo *et al.* (2014), dove sono stati raccolti in un periodo di 2 anni (da Novembre 2012 a Giugno 2014) 513 campioni da broiler allevati in nord Italia, ha identificato la circolazione di 5 genotipi di IBV nell'area campionata. Il genotipo più diffuso è risultato il QX (72%) seguito dal genotipo 793B, che non è stato più trovato da luglio 2013 (dopo la fine della vaccinazione con tale genotipo). In questo studio si ipotizza che tutti i campioni di IBV genotipo 793B fossero ceppi vaccinali (infatti tutti presentano elevatissima omologia nella regione ipervariabile della S1 con le sequenze dei due vaccini utilizzati in Nord Italia).

L'ipotesi di circolazione di ceppi vaccinali di IBV è riportata anche nello studio di Pohjola *et al.* (2014) dove sono stati identificati ceppi di IBV genotipo D274 e 793B in Finlandia.

In entrambi i casi gli autori ipotizzano l'origine vaccinale dei ceppi identificati, o su base epidemiologica o su omologia delle sequenze con i ceppi vaccinali. Importante risulta essere però l'identificazione di *marker* vaccinali in tratti genomici conosciuti che inequivocabilmente differenzino ceppi di campo da ceppi di origine vaccinale. Questo metodo di distinzione viene attualmente utilizzato per distinguere i ceppi di campo con i ceppi vaccinali per il genotipo Arkansas (Ndegwa *et al.*, 2012), per l'Influenza aviaria (James *et al.*, 2008, Kamal *et al.*, 2014) e per il *Metapneumovirus* aviaria (Catelli *et al.*, 2006; Listorti *et al.*, 2014; Cecchinato *et al.*, 2014).

Un ulteriore obiettivo di questa tesi è stato quello di ricercare eventuali differenze genomiche tra il vaccino basato su un ceppo genotipo QX, attualmente in commercio in Europa e da poco registrato anche in Italia, e i ceppi di campo circolanti in Italia, in modo da creare un metodo utile per poter distinguere tra i due ceppi quando il vaccino verrà utilizzato ampiamente nel nostro Paese.

Per fare ciò sono state analizzate le sequenze delle basi nucleotidiche di tutti i campioni e si sono messe a confronto con la sequenza genomica del vaccino (dedotta da Geerlings *et al.*, 2011) e quella del progenitore (ceppo L-1148A, accession number *GenBank* DQ341199) da cui è stato ottenuto il vaccino.

È stato quindi possibile definire diverse posizioni “*marker*” che permettono di distinguere gli stipiti italiani dalla sequenza del ceppo progenitore (Tab. 9); inoltre questi *marker* possono essere utilizzati per distinguere gli stipiti italiani dalla sequenza del ceppo vaccinale.

Tabella 9 Differenze nucleotidiche e amminoacidiche in base alla posizione genomica nel gene *S1* tra progenitore, vaccino e ceppi italiani

Posizione genomica	NUCLEOTIDI			AMMINOACIDI CODIFICANTI		
	Progenitore	Vaccino	Ceppi Italiani	Progenitore	Vaccino	Ceppi Italiani
312	t	t	c	C	C	C
540	c	c	t	S	S	S
543	t	t	c	N	N	N
656	a	a	g	Q	Q	R
664	g	g	a	V	V	I
702	t	t	c	C	C	C
732	c	c	t	G	G	G
765	g	g	t	R	R	S
786	c	c	t	R	R	R
806	c	t	c	T	I	T
1100	g	g	a	S	S	N
1122	c	c	t	Y	Y	Y
1168	g	t	g	G	F	G
1169	g	t	g			
1171	g	c	g	E	Q	E
1181	c	c	a	T	T	K
1531	a	a	t	I	I	F

È stato anche notato che tra il vaccino e i campioni analizzati è presente una differenza nel nucleotide 806, che è uguale nei campioni e nel progenitore (nucleotide C) ma diverso nel vaccino (nucleotide T) e una differenza nella regione 1168-1171. Queste differenze provocano poi un cambiamento degli amminoacidi relativi, potenzialmente implicati nel

processo di attenuazione (Tab. 9). Come tali possono essere considerate dei “*marker* vaccinali” e potranno adiuvarne la differenziazione degli stipiti vaccinali da quelli di campo, indipendentemente dalla naturale variabilità dei ceppi circolanti, frutto dell’evoluzione o di potenziali nuove introduzioni.

Data la presenza di *marker* vaccinali abbiamo voluto verificare se fossero presenti degli enzimi di restrizione che riuscissero a riconoscere quella specifica sequenza nucleotidica all’interno del genoma e, una volta legati a questa, fossero in grado di tagliare selettivamente la sequenza *target*, rendendo possibile differenziare i diversi stipiti in base alla lunghezza delle bande ottenute.

In particolare, in questo lavoro è stato trovato in posizione 785 della regione ipervariabile S1 il sito di riconoscimento dell’enzima di restrizione *NruI*. Questo *marker* potrebbe essere utile per la messa a punto di una PCR che amplifica una regione che include tale posizione nucleotidica e quindi per una rapida discriminazione fra gli stipiti di campo italiani e il ceppo vaccinale.

Tale approccio viene già utilizzato nella diagnostica delle malattie respiratorie aviari per distinguere tra ceppo di campo e ceppo vaccinale, per esempio nella Rinotracheite del tacchino causata da *Metapneumovirus* aviare (aMPV) utilizzando una RT *nested*-PCR seguita da digestione enzimatica, come descritto in un articolo di Listorti *et al.* (2014).

La presenza di *marker* nucleotidici rende ipotizzabile la messa a punto di altre metodiche diagnostiche, ad esempio basate sulla *real time* RT-PCR, specificamente validate al fine di permettere una rapida differenziazione fra stipiti vaccinali e di campo.

Nel corso del presente lavoro si sono anche riscontrate diverse differenze nucleotidiche tra il progenitore e i campioni analizzati (come visibile dalla Tab. 9). Probabilmente questo è spiegabile con il fatto che il progenitore è di derivazione inglese e durante la diffusione in Italia il virus ha subito molte mutazioni, come tutti i virus a RNA, per adattarsi al nuovo ambiente naturale e agli ospiti, mutazioni che hanno creato variazioni nucleotidiche e amminoacidiche nel genoma virale.

Risulta infatti evidente nella Fig. 19 che le sequenze italiane formano un *clade* ben distinto rispetto a stipiti campionati in altri paesi d’Europa.

Dall’analisi effettuata sembra inoltre che i ceppi italiani siano vicini genotipicamente ad un ceppo di origine spagnola campionato nel 2009, rispetto ai restanti stipiti europei.

Tuttavia, queste conclusioni devono essere trattate con la dovuta cautela, a causa della limitata attività di campionamento e di sequenziamento; ciò impedisce di escludere la

presenza di altri stipiti presenti in diversi stati europei, che non sono stati sequenziati finora, ma che in realtà potrebbero essere maggiormente correlati ai ceppi italiani.

Le differenze osservate tra i ceppi italiani genotipo QX e il vaccino omologo registrato in Italia pongono dei quesiti sulla reale efficacia di tale vaccino. Sarà quindi importante valutare, tramite un'infezione sperimentale, la protezione reale indotta da questo nei confronti dei ceppi che attualmente circolano in Italia. Va tenuto in considerazione però, come riportato da De Wit (2011), che la relazione tra il livello di omologia della regione S1, tra ceppo e vaccino, e la protezione assicurata dal vaccino stesso non è direttamente proporzionale, ma dipende anche da molteplici fattori tra cui differenze genomiche in regioni diverse dal gene S1.

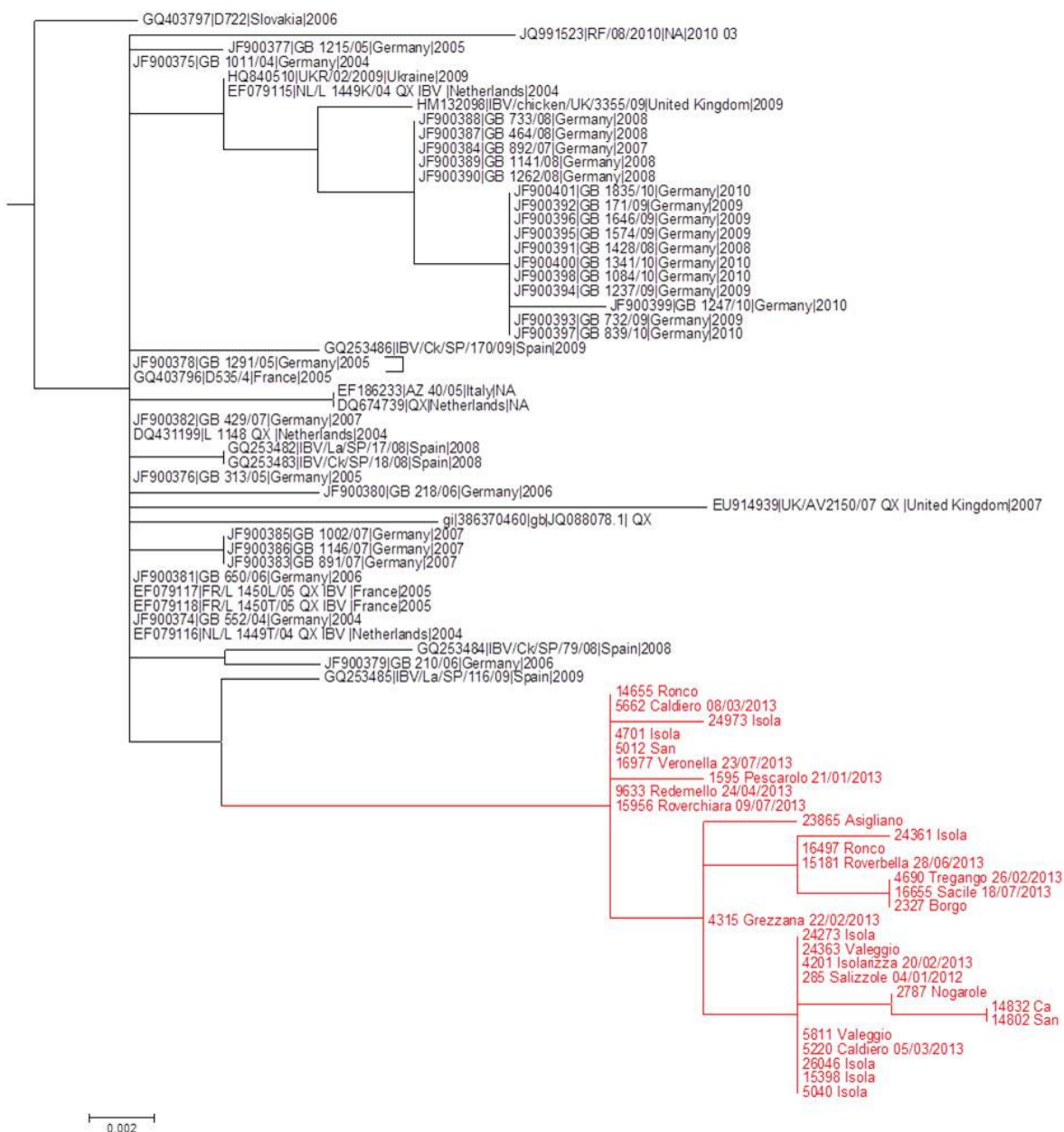


Figura 19 Albero filogenetico ricostruito a partire da un campione rappresentativo di sequenze italiane e mondiali. Le sequenze ottenute durante il presente studio sono evidenziate in rosso

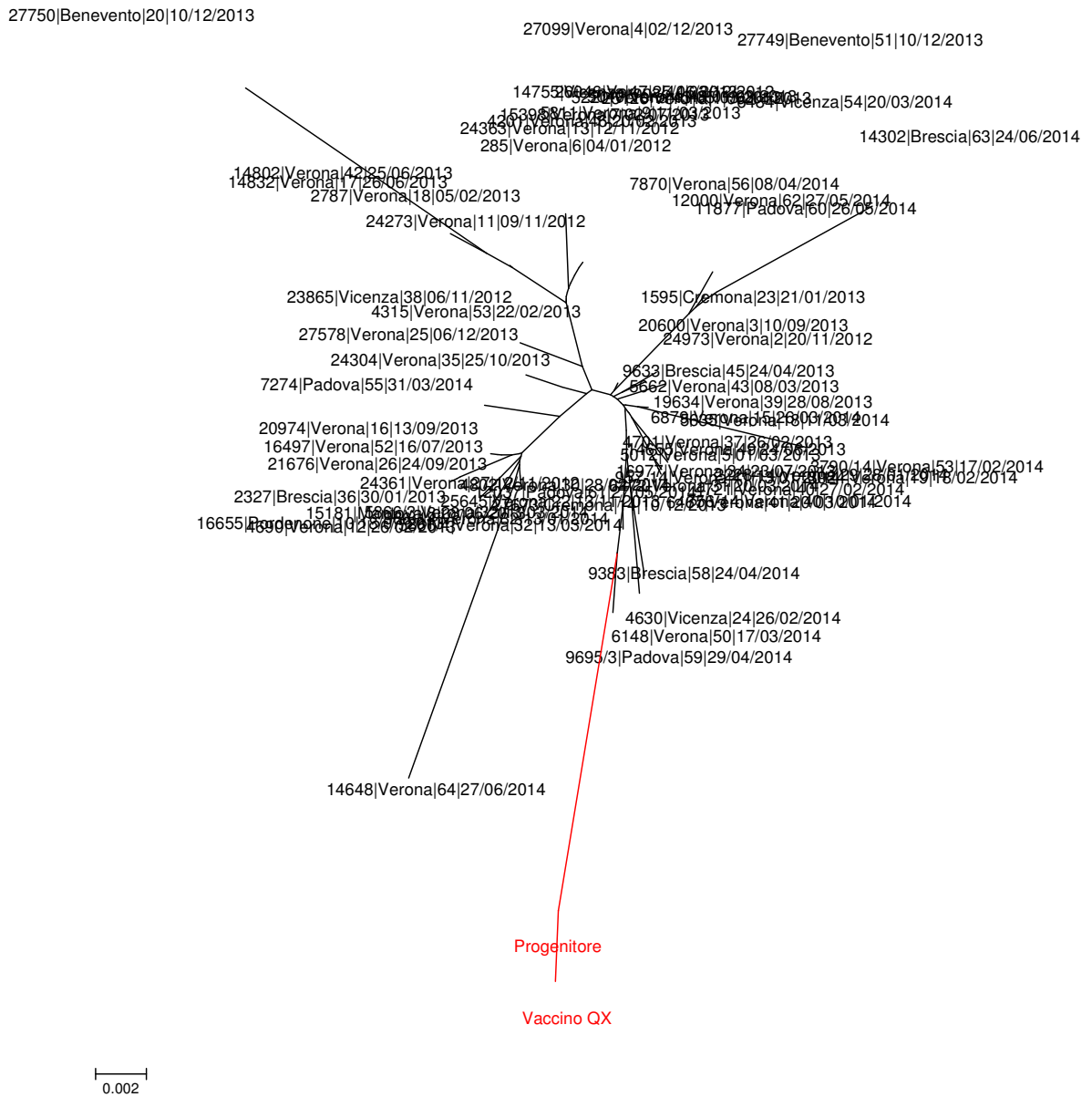


Figura 20 Albero filogenetico radiale basato sulle sequenze parziali del gene S1 dei campioni studiati, del vaccino QX e del suo progenitore. In rosso sono evidenziati il vaccino QX e il suo progenitore

8.2.2 Variabilità nucleotidica dei ceppi di IBV

La variabilità nucleotidica dei ceppi di IBV genotipo QX è stata analizzata considerando la regione ipervariabile dell'S1 nonché, quando disponibile, l'S1 completa. È stata altresì valutata la variabilità amminoacidica della proteina S1.

Si è valutato che i ceppi appartenenti al genotipo QX nella regione ipervariabile presentano una variabilità tra le sequenze compresa tra 0% e 3.4%, con media dello 0.8%; mentre per l'intera regione la variabilità nucleotidica è compresa tra 0.1% e 1.4%, con media dello 0.7%.

La variabilità amminoacidica dell'S1 è compresa tra 0 e 2.2% con media dell'1.1%.

La distanza amminoacidica tra il vaccino e i ceppi analizzati, invece, (escludendo il progenitore) varia tra 2.4% e 4.6%; mentre la distanza nucleotidica è compresa tra 1.5% e 3.5%.

Confrontando la variabilità interna ai ceppi e quella tra questi e il vaccino si può notare che è facile discriminare tra i ceppi di campo e il vaccinale, poiché c'è notevole distanza tra il vaccino e i singoli ceppi italiani (almeno dell'1.5%), mentre la variabilità media all'interno dei ceppi di campo è molto più bassa. Questa condizione è stata spiegata nel paragrafo precedente ed è visibile graficamente nella Fig. 20: il progenitore del vaccino è di derivazione inglese e si presenta diverso dai ceppi italiani che invece formano un gruppo distinto da quelli del resto d'Europa.

L'analisi delle singole sequenze italiane ha permesso di evidenziare la presenza di delezioni amminoacidiche: per esempio nel campione numero 14655 manca l'amminoacido 25, mentre nel campione 24890 sono deleti gli amminoacidi 59 e 60; queste regioni amminoacidiche rappresentano delle regioni epitopiche (cioè delle strutture proteiche che sono molto soggette a mutazioni, poiché hanno un ruolo nella protezione inducendo la risposta immunitaria dell'ospite) come affermato in uno studio di Kant *et al.* (1992), che posiziona una delle tre regioni epitopiche di IBV tra i residui amminoacidici 24 e 61.

Le frequenti delezioni che avvengono in questa regione si suppone rappresentino un modo per sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite e potrebbero comportare nel tempo la formazione di nuovi ceppi potenzialmente patogeni, anche se le reali conseguenze sulla patogenicità restano ancora ignote.

8.2.3 Entropia delle sequenze dei ceppi di IBV

Accanto alle analisi di variabilità sono state effettuate misurazioni del valore di entropia associato ad ogni posizione nucleotidica e amminoacidica e, confrontando graficamente le sequenze, si sono potute valutare immediatamente le differenze tra il tasso di sostituzione nucleotidica e il cambiamento degli amminoacidi codificati.

Come si vede dalla Fig. 21, il valore di entropia a livello nucleotidico è molto elevato e uniforme (il valore del tasso di sostituzione nucleotidica noto è stato stimato essere 3.2×10^{-3} sostituzioni/sito/anno), infatti i virus a RNA sono molto variabili, ma la sequenza amminoacidica presenta una entropia mediamente più bassa e concentrata in alcune regioni; ciò indica che sono presenti tratti con una diversa frequenza di sostituzioni sinonimo e non-sinonimo, conseguenza dell'azione di diverse pressioni selettive.

8.2.4 Pressione Selettiva

L'esistenza di pressione selettiva sul genoma dei ceppi QX analizzati in questo studio è stata misurata confrontando i tassi di sostituzione sinonimo e non-sinonimo (dN-dS).

Per massimizzare le informazioni ottenibili sono stati utilizzati diversi metodi per l'individuazione dei siti sottoposti a pressione selettiva (SLAC, REL, FUBAR).

Come è possibile vedere confrontando la Fig. 21 con la Fig. 22, i siti sottoposti maggiormente a pressione selettiva diversificante sono anche quelli che presentano maggiore variabilità amminoacidica: infatti, come ci si aspetterebbe, in questi siti il valore di dN-dS (che esprime la tendenza alla fissazione delle sostituzioni nucleotidiche che comportano o meno un cambiamento nella sequenza amminoacidica) è positivo.

Ad esempio, un tratto in cui c'è un eccesso di sostituzioni non-sinonimo (che provocano una differenza nella sequenza nucleotidica e anche nell'amminoacido codificato) caratteristiche di un sito sottoposto a pressione diversificante, è il tratto tra i codoni 15 e 65 e un ulteriore tratto molto evidente è quello tra i codoni 295 e 340; come si vede nella Fig. 22, questi corrispondono a porzioni in cui la variabilità amminoacidica è maggiore e più concentrata. Questa regione rappresenta un sito epitopico, come affermato in uno studio di Kant *et al.* (1992) e in uno studio di Ignjatovic e Sapats (2005).

Al contrario la pressione purificante, presente in tratti ricchi di sostituzioni sinonimo (sostituzioni dei nucleotidi, ma non dell'amminoacido codificato, poiché il codice genetico è degenerato) risulta essere predominante ed interessa primariamente i siti non epitopici. Questo risultato riflette delle limitazioni di tipo strutturale e funzionale della proteina, per le quali variazioni nelle proprietà chimico-fisiche di alcuni aminoacidi risulterebbero svantaggiose.

Il riscontro di siti sottoposti a pressione purificante anche nelle regioni epitopiche non risulta comunque sorprendente, poiché alcune porzioni di queste regioni, sebbene evidentemente dotate di una maggiore plasticità, sono anch'esse implicate nel *fold*ing appropriato della proteina e nella sua funzionalità.

Come descritto nell'articolo di Holmes (2009), in generale nei virus a RNA (quindi si suppone anche in IBV) il tasso di sostituzioni sinonimo è molto più alto di quello delle sostituzioni non-sinonimo, poiché queste ultime risultano svantaggiose per il virus e vengono rimosse dalla forte selezione negativa.

Esempi di pressioni selettive sono, prima tra tutte: la differenza nei programmi vaccinali e nei metodi di applicazione che possono dare vita a pressioni di diversa entità che potrebbero creare ceppi più resistenti di altri, i cambiamenti nell'ambiente naturale a cui il virus può o meno riuscire ad adattarsi, il fatto che gruppi animali di differenti età e con livelli anticorpali diversi possono favorire la nascita di ceppi resistenti ai vaccini attualmente utilizzati, l'alta densità negli allevamenti che può provocare uno stress negli animali con relativo abbassamento della resistenza immunitaria.

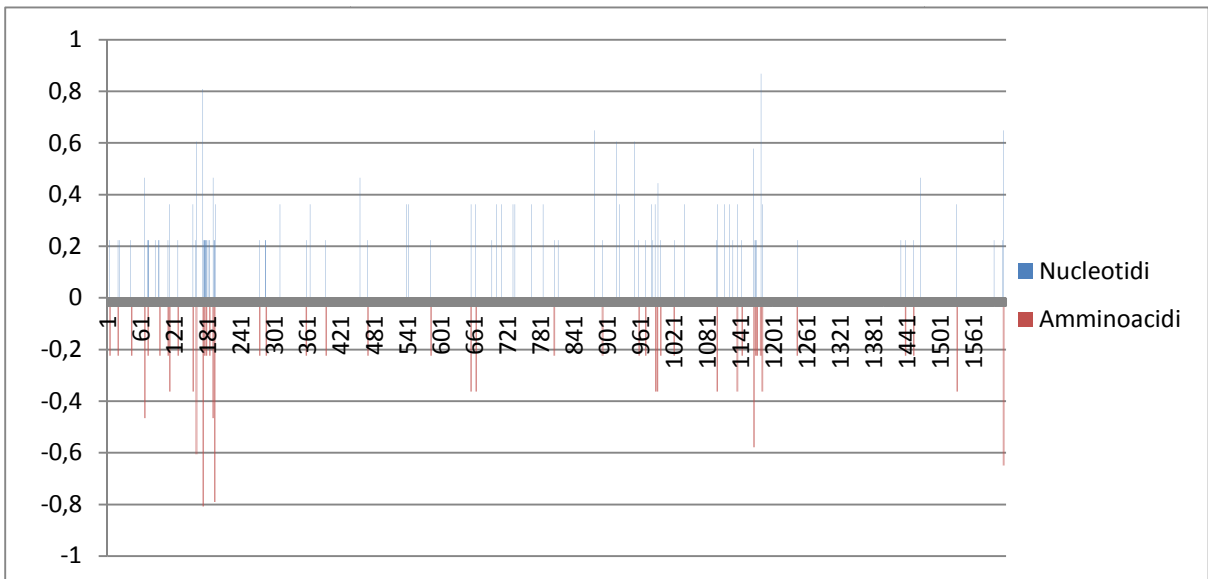


Figura 21 Tasso di entropia a livello nucleotidico e amminoacidico dei ceppi QX analizzati

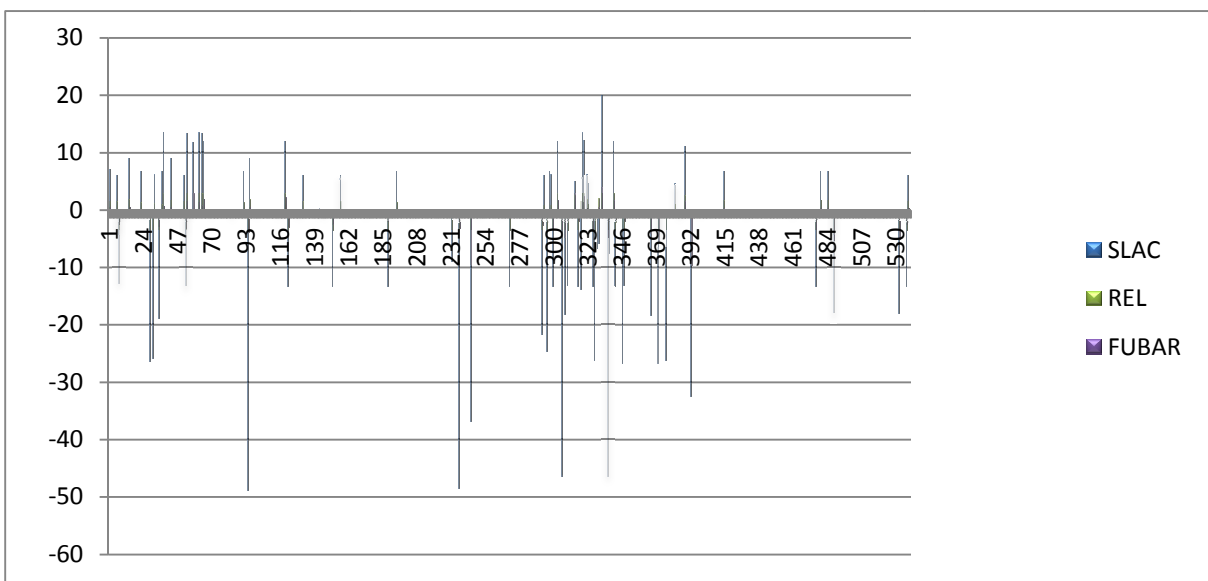


Figura 22 Tasso di pressione selettiva dei ceppi QX analizzati

8.2.5 Distribuzione geografica dei ceppi QX e analisi filogenetica

Grazie all'associazione di ogni campione con data di campionamento e indirizzo dell'azienda (specificando latitudine e longitudine) è stato possibile ricostruire una mappa della distribuzione dei vari campioni sul territorio nazionale (Fig. 23).

Come è possibile notare dalla figura, il genotipo QX è molto presente nella zona del Triveneto, in particolare a Verona, che è un'area ad elevata densità di allevamento avicolo; tuttavia si ritrova anche in zone limitrofe, come nei pressi di Cremona o Rovigo e alcuni campioni provengono anche dalla provincia di Padova e Pordenone. Soltanto due campioni vengono da Benevento.

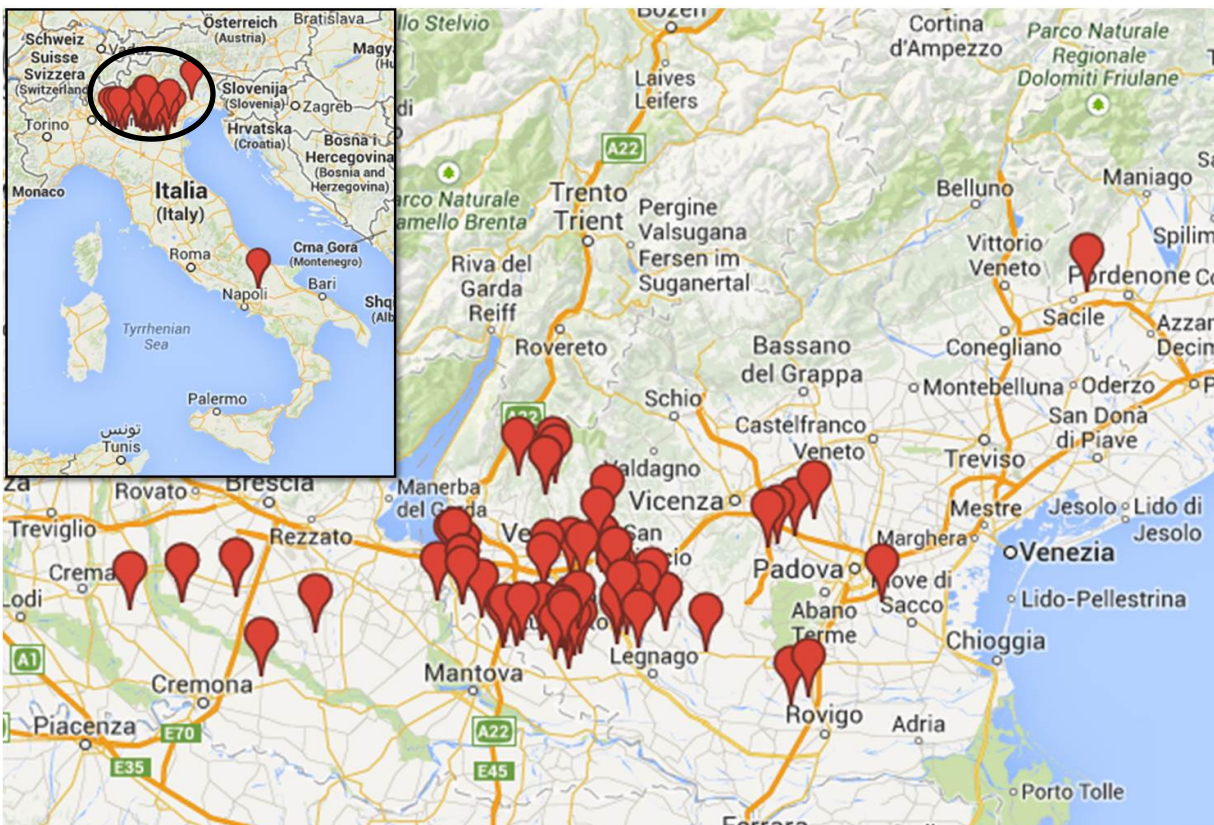


Figura 23 Distribuzione geografica dei campioni della Bronchite Infettiva genotipo QX analizzati nella presente tesi

È stata poi creata un'analisi filogeografica, mettendo in relazione la zona di distribuzione dei campioni analizzati con la data di prelievo. Come è possibile notare dalla Fig. 24, tutte le sequenze “periferiche” in nostro possesso sembrano originare da un nucleo centrale, localizzato nella zona di Verona, e non essere frutto di una circolazione a livello locale; particolarmente suggestivo è il caso dei due campioni di Benevento, i quali derivano indipendentemente dal nucleo veronese e non sono in relazione tra loro, diversamente da

come ci si aspetterebbe. Sarebbe interessante capire, in studi futuri, come lo stesso genotipo abbia allargato il suo areale dalla zona del Triveneto a Benevento e come ci siano stati due ceppi di IBV genotipo QX che dal Nord sono arrivati fino al Centro-Sud Italia. La filiera produttiva da cui deriva la maggior parte dei campioni analizzati è presente principalmente nel Nord Italia e in poche aziende del Centro e Sud Italia, dove la densità di allevamenti è molto bassa.

Non è stato possibile capire l'origine di questa infezione, ma si potrebbe sospettare che il genotipo QX sia presente anche in allevamenti del Centro Italia e/o limitrofi a quelli risultati positivi a Benevento non appartenenti alla filiera produttiva oggetto di studio. Tuttavia, l'elevata identità con virus campionati nel veronese pare supportare maggiormente l'ipotesi che ci siano state delle connessioni epidemiologiche (es. stesso tecnico/veterinario o camion dedito al trasporto del mangime, ecc.) tra allevamenti del Nord e del Centro Italia all'interno della stessa filiera produttiva.

Con questa analisi è stata creata una sequenza probabilistica che, a partire dal momento in cui è stato stimato l'antenato comune che ha dato origine alle sequenze in nostro possesso, ha permesso di ricostruire la diffusione virale nel tempo, stimando la localizzazione anche di sequenze ancestrali non campionate. Questa analisi è soltanto probabilistica e parziale, a causa dei limiti delle informazioni contenute e del numero dei campioni, ciononostante è utile per comprendere i *trend* che caratterizzano la diffusione generale del genotipo QX e il suo areale di distribuzione.



Figura 24
Ricostruzione filogeografica della distribuzione degli stipti di Bronchite Infettiva genotipo QX nel tempo

8.2.6 Analisi dell'età sintomatologica dei campioni studiati

È stata anche messa a confronto l'età di manifestazione dei sintomi in funzione del protocollo vaccinale utilizzato. È opportuno ricordare come gli animali fossero sottoposti ad un protocollo vaccinale che prevedeva una prima vaccinazione in incubatoio (vaccino H120) seguita da un richiamo in allevamento (vaccino basato su genotipo 793B).

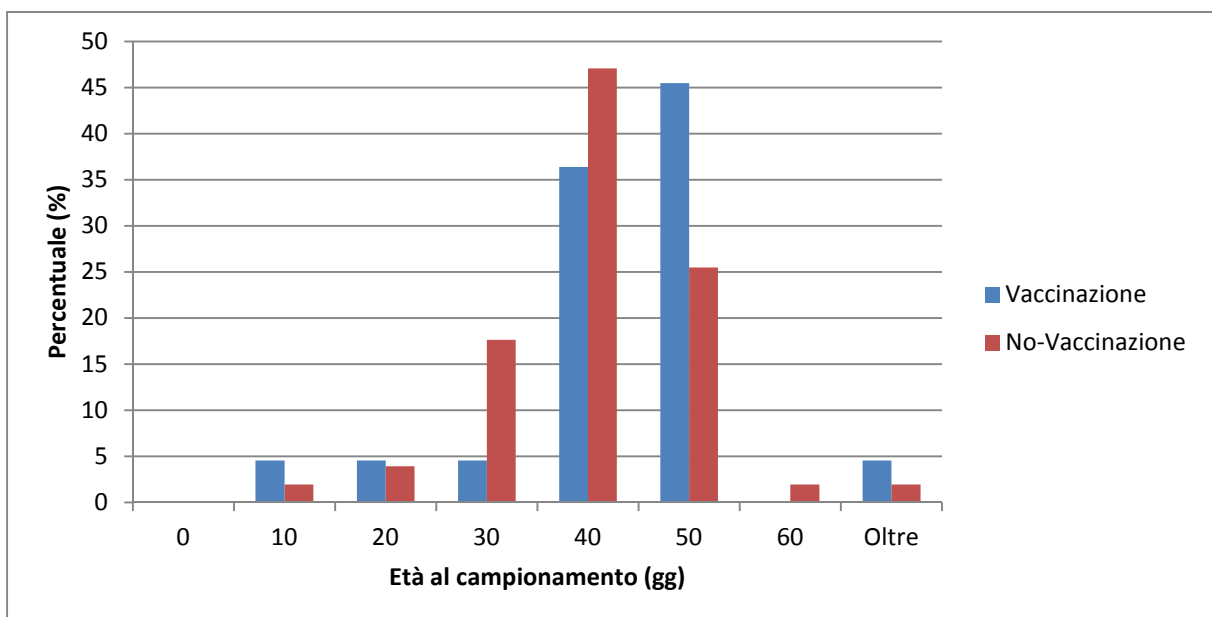
A partire da Giugno 2013 per scelta gestionale aziendale, la somministrazione del vaccino in allevamento è stata sospesa.

A ciò è seguita una più precoce comparsa di sintomatologia respiratoria: è stato infatti riscontrato che in generale l'età di comparsa di sintomatologia respiratoria imputabile a IBV si è abbassata e negli animali non vaccinati l'età più critica è tra i 40 e i 50 giorni (Tab. 10).

È possibile ipotizzare che questa evidenza sia riconducibile al venir meno dell'effetto protettivo indotto dal richiamo e che quindi il vaccino utilizzato finora negli allevamenti fosse efficace, almeno in parte, contro il genotipo QX, come affermato da Terregino *et al.* (2008) e da Massi *et al.* (2010).

In animali non vaccinati, al diminuire dell'immunità materna l'animale diventa più precocemente suscettibile alla patologia, anche se il numero totale di casi clinici non sembra variare in modo significativo. Questo fa supporre che la copertura indotta dal vaccino 793B contribuisce a limitare l'infezione, ma non dà una protezione completa, come era stato notato dallo studio di Pascucci (2013).

Tabella 10 Distribuzione percentuale, nelle diverse fasce di età, della comparsa di sintomatologia clinica in animali vaccinati (evidenziati in blu) e non (evidenziati in rosso) con il vaccino 793B in allevamento



CONCLUSIONI

Recenti studi epidemiologici condotti in Italia e in Europa hanno evidenziato come il virus della Bronchite Infettiva aviaria genotipo QX sia attualmente il genotipo di campo più diffuso, se non l'unico presente, e sia in grado di creare problemi nell'industria avicola del pollo da carne e della gallina ovaiole.

Attualmente l'unico modo per controllare l'infezione da virus IBV genotipo QX è rappresentato da un piano vaccinale basato su due vaccini eterologhi (H120 in incubatoio e 793B dopo la seconda settimana di vita).

Alcune filiere avicole hanno deciso di interrompere la seconda vaccinazione e nel presente studio si è messo in evidenza che i focolai di malattia imputabile ad IBV sono stati riscontrati in animali con età inferiore quando non sottoposti a richiamo vaccinale. Questo potrebbe essere imputabile ad una non completa protezione e potrebbe comportare danni maggiori per l'industria avicola, poiché vengono colpiti animali più giovani con maggiore sensibilità al patogeno.

In futuro, per il controllo della malattia, è previsto l'utilizzo di un vaccino omologo basato sul progenitore inglese del genotipo QX, registrato in alcuni paesi europei e recentemente anche in Italia.

In questo studio sono state rivelate notevoli differenze genomiche nel gene S1 tra i ceppi analizzati, rappresentativi dei virus circolanti in Italia, e il vaccino QX. Tali differenze potrebbero influenzare la reale efficacia del vaccino, che andrà valutata mediante un'infezione sperimentale. È infatti noto come la protezione assicurata dai vaccini non è direttamente proporzionale al livello di omologia della regione S1 tra ceppo e vaccino, ma dipende anche da altri fattori legati a mutazioni in punti chiave del genoma virale (De Wit *et al.*, 2011).

Se da un lato le differenze riscontrate tra i ceppi di campo italiani e il vaccino genotipo QX potrebbero influenzare il grado di protezione di quest'ultimo, dall'altro hanno permesso anche l'individuazione di *marker* vaccinali che potranno essere utilizzati per effettuare una rapida differenziazione tra stipiti vaccinali e di campo. Sulla base dei nostri risultati sarà quindi possibile effettuare un'indagine epidemiologica corretta e valutare il reale impatto dei ceppi di campo di Bronchite Infettiva aviaria in Italia.

Data la presenza di *marker* vaccinali abbiamo voluto verificare se fossero presenti degli enzimi di restrizione che riuscissero a riconoscere quella specifica sequenza nucleotidica all'interno del genoma e, una volta legati a questa, fossero in grado di tagliarla, rendendo possibile differenziare i diversi stipiti in base alla lunghezza delle bande ottenute.

Inoltre, l'identificazione di un sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione *NruI*, in grado di tagliare selettivamente la sequenza *target* del vaccino e non quella dei ceppi di campo, potrebbe essere utile per la messa a punto di una PCR che amplifica una regione che include tale posizione nucleotidica e quindi per una rapida discriminazione fra gli stipiti di campo italiani e il ceppo vaccinale.

La disponibilità di sequenze ha permesso inoltre di studiare le forze selettive che agiscono nel modellare l'evoluzione di questo patogeno. La rilevante tendenza alla diversificazione dei siti epitopici riscontrata, anche in un database parziale come quello considerato, evidenzia l'importante ruolo della risposta immunitaria nel condizionare la variabilità virale.

Sono stati, infine, riscontrati anche due distinti eventi di ricombinazione in ceppi di IBV, aventi come stipiti parentali virus appartenenti ai genotipi QX e 793B. Uno di questi due si è dimostrato uguale a ceppi identificati in un altro studio (Moreno *et al.*, 2014) in zone limitrofe a quella in cui il nostro campione è stato prelevato. Sarà interessante in studi futuri valutare se questi ceppi ricombinanti possano diffondersi in Italia oppure, al contrario, non avere capacità di endemizzarsi e quindi scomparire dal territorio.

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo A.M., Perera C.L., Vega A., Ríos L., Coronado L., Relova D.M.T., Frías M.T., Ganges L., Núñez J.I., Pérez L.J., 2013. *A duplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Massachusetts and non Massachusetts serotypes of infectious bronchitis virus*. *Molecular and Cellular Probes*, **27** (5-6): 184-192.
- Adler H.E., Mc Martin D.A., Ortmyer H., 1962. *The effect of infectious bronchitis virus on chickens infected with Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, **6** (3): 267-274.
- Almeida D.O., Tortelly R., Nascimento E.R., Chagas M.A., Khan M.I., Pereira V.L., 2012. *Avian infectious bronchitis and deep pectoral myopathy - a case control study*. *Poultry science*, **91** (12): 3052-3056.
- Ambali A.G., Jones R.C., 1990. *Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus*. *Avian Diseases*, **34** (4): 809-817.
- Anisimova M., Gil M., Dufayard J.-F., Dessimoz C., Gascuel O., 2011. *Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes*. *Systematic Biology* **60** (5), 685-699.
- Beach J.R. e Schalm O.W., 1936. *A filtrable virus, distinct from that of laringotracheitis, the cause of a respiratory disease in chicks*. *Poultry Science*, **15**: 199-206.
- Beato M.S., De Battisti C., Terregino C., Drago A., Capua I., Ortali G., 2005a. *Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy*. *The Veterinary Record*, **156** (22): 720.
- Beato M.S., Terregino C., De Nardo R., Toffan A., Cattoli G., Capua I. 2005b. *Epidemiological study on circulation of infectious Bronchitis Virus strains in North Eastern Italy*. *Italian Journal of Animal Science*, **4**, 263-265.
- Beaudette F.R. e Hudson C.B., 1937. *Cultivation of the virus of infectious bronchitis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **90**: 51-58.
- Benyeda Z, Szeredi L., Mató T., Süveges T., Balka G., Abonyi-Tóth Z., Rusvai M., Palya V., 2010. *Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens*. *Journal of Comparative Pathology*, **143** (4): 276-283.
- Benyeda Z., Mató T., Süveges T., Szabó E., Kardi V., Abonyj-Tóth Z., Rusvai M., 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.*
- Bhattacharjee P.S., Carter S.D., Savage C.E., Jones R.C., 1995. *Re-excretion of infectious bronchitis virus in chickens induced by cyclosporin. Avian Pathology, 24 (3): 435-441.*
 - Boltz D.A., Zimmerman C.R., Nakai M., Bunick D., Scherba G., Bahr J.M., 2006. *Epididymal stone formation and decreased sperm production in roosters vaccinated with a killed strain of avian infectious bronchitis virus. Avian diseases, 50 (4): 594-598.*
 - Broadfott D.I., Pomeroy B.S., Smith W.M. Jr., 1954. *Effect of infectious bronchitis on egg production. Journal of the American Veterinary Medical Association, 124 (923): 128-130.*
 - Catelli E., Cecchinato M., Savage C.E., Jones R.C., Naylor C.J., 2006. *Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. Vaccine, 24 (42-43): 6476-6482.*
 - Cavanagh D. e Naqi S.A., 2003 “Infectious Bronchitis”. In: Saif Y.M., Barnes H.J., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Swayne D.E., 2003. *Diseases of Poultry, 11° edizione. Ames, Iowa State University Press, pp.101-119.*
 - Cavanagh D., Davis P.J., Cook J.K.A., 1992. *Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. Avian Pathology, 21 (3): 401-408.*
 - 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.*
 - Cavanagh, D., Elus M.M., Cook J.K., 1997. *Relationship between sequence variation in the SI spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. Avian Pathology, 26 (1): 63-74.*
 - Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Prosperi S., Naylor C.J., 2014. *Reversion to virulence of a subtype B avian metapneumovirus vaccine: is it time for regulators to require availability of vaccine progenitors? Vaccine, 32 (36): 4660-4664.*
 - Charlton B.R., 2006. “Bronchite infettiva”. In: Bermudez A.J., Boulianne M., Halvorson D.A., Schrader J.S., Newman L.J., Sander J.E., Wakenell P.S., *Manuale di patologia aviare. 6° edizione, American Association of Avian Pathologist, edizione italiana stampata a Sesto Fiorentino (FI), pp. 49-52.*
 - Chen B.Y. e Itakura C., 1997. *Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to avian infectious bronchitis virus in chicks uninoculated and previously inoculated with highly virulent infectious bursal disease virus. Avian Pathology, 26 (3): 607-624.*

- Chen H.W., Huang Y.P., Wang C.H., 2009. *Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan*. *Virus research*, **140** (1-2): 121-129.
- Chong K.T. e Apostolov K., 1982. *The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus*. *Journal of Comparative Pathology*, **92** (2): 199-211.
- Chousalkar K.K. e Roberts J.R., 2007. *Ultrastructural observations on effects of infectious bronchitis virus in eggshell-forming regions of the oviduct of the commercial laying hen*. *Poultry science*, **86** (9): 1915-1919.
- Chousalkar K.K. e Roberts J.R., 2007. *Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens*. *Veterinary Microbiology*, **122** (3-4): 223-236.
- Chousalkar K.K., Cheetham B.F., Roberts J.R., 2009. *LNA probe-based real-time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct of unvaccinated and vaccinated laying hens*. *Journal of virological methods*, **155** (1): 67-71.
- Cook J.K., 1971. *Recovery of infectious bronchitis virus from eggs and chicks produced by experimentally inoculated hens*. *Journal of Comparative Pathology*, **81** (2): 203-211.
- Cook J.K.A., 2008. "Coronaviridae". In: Pattison M., McMullin P.F., Bradbury J.M., Alexander D.J., *poultry diseases*. 6° edizione, ELSEVIER, Toronto, 2008, pp. 340-349.
- 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.
- Cowen B.S. e Hitchner S.B., 1975. *Serotyping of avian infectious bronchitis virus by the virus-neutralization test*. *Avian diseases*, **19** (3): 583-595.
- Cumming R.B., 1969. *The control of avian infectious bronchitis/nephrosis in Australia*. *Australian Veterinary Journal*, **45** (4): 200-203.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D., 2012. *JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing*. *Nature Methods* **9**, 772.
- De Wit J.J., 2006. *Un nuovo capitolo sull'argomento false ovaiole*. Atti della giornata di studio Intervet, Italia, Bologna, 7 giugno 2006.
- De Wit J.J., 2010. *Detection of infectious bronchitis virus*. *Avian Pathology*, **29** (2): 71-93.
- De Wit J.J., Cook J.K.A., van der Heijden H.M., 2011. *Infectious bronchitis virus variants: a review of history, current situation and control measures*. *Avian Pathology*, **40** (3): 223-235.

- De Wit J.J., Nieuwenhuisen-van Wilgen J., Hoogkamer A., van de Sande H., Zuidam G.J., Fabri T.H., 2011. *Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination*. Avian Pathology, **40** (5): 463-471.
- Dolz R., Vergara-Alert J., Perez. M., Pujols J., Majo N., 2012. *New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens*. Veterinary microbiology, 156 (3-4): 256-264.
- Fan W-Q., Wang H.N., Zhang Y., Guan Z.B., Wang T., Xu C.W., Zhang A.Y., Yang X., 2012. *Comparative Dynamic Distribution of Avian Infectious Bronchitis Virus M41, H120, and SAIBK Strains by Quantitative Real-Time RT-PCR in SPF Chickens*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **76** (12): 2255-2260.
- Franzo G., Naylor C.J., Lupini C., Drigo M., Catelli E., Listorti V., Laconi A., Pesente P., Rossi G., Cechinato M., 2014. *793B became undetectable in Northern Italy after homologous vaccine application was discontinued*. In: 8° International Symposium on Avian Corona-and Pneumoviruses and Complicating Pathogens – Programme and abstracts, Rauschholzhausen, Germany, 17-20 giugno 2014, p. 15.
- Ganapathy K., Wilkins M., Forrester A., Lemiere S., Cserep T., McMullin P., 2012. *QX-like infectious bronchitis virus isolated from cases of proventriculitis in commercial broiler in England*. Veterinary Record, **171** (23): 597.
- Geerligs H.J., Boelm G.-J., Meinders A.M., Stuurman B.G.E., Symons J., Tarres-Call J., Bru T., Vila R., Mombarg M., Karaca K., Wijmenga W., Kumar M., 2011. *Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens*. Avian Pathology, **40** (1): 93-102.
- Gelb J., Jackwood M.W., 2008. "Infectious Bronchitis". In: Dufour-Zavala L., Swayne D.E.; Glisson J.R., Pearson J.E., Reed W.M., Jackwood M.W., Woolcock P.R., 2008. *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*. 5° edizione, American Association of Avian Pathologist, Athens, 2008, pp. 146-149.
- Glahn R.P., Wideman R.F., Cowen B.S., 1989. *Order of exposure to high dietary calcium and Gray strain infectious bronchitis virus alters renal function and the incidence of urolithiasis*. Poultry Science, **68** (9): 1193-1204.
- Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O., 2010. *New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0*. Systematic Biology **59** (3), 307-321.

- Hall T.A., 1999. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series N° **41**, 95-98.
- Hofstad M.S., 1965. "Infectious Bronchitis". In: Biester H.E. e Schwarte L.H., 1965. *Diseases of poultry*. 5° edizione, The Iowa State University Press, Iowa U.S.A., 1965, pp. 605-620.
- Hofstad M.S. e Kenzy S.G., 1950. *Susceptibility of chicks hatched from recovered hens to infectious bronchitis*. Cornell veterinarian, **40**: 87-89.
- Holmes E.C., 2009. *The evolutionary Genetics of Emerging Viruses*. The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, **40** (1): 353-372.
- Ignjatovic J. e Sapats S., 2005. *Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus*. Archives of Virology **150** (9): 1813-1831.
- Jackwood M. W e De Wit S., 2013. "Infectious bronchitis". In: Swayne D. E., Glisson J.R., Mc Dougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L., Nair V., 2013. *Diseases of poultry*. 13° edizione, Wiley-Blackwell, pp.139-159.
- James C.M., Foong Y.Y., Mansfield J.P., Vind A.R., Fenwick S.G., Ellis T.M., 2008. *Evaluation of a positive marker of avian influenza vaccination in ducks for use in H5N1 surveillance*. Vaccine **36** (42): 5345-5351.
- Jones R.C., Khehra R.S., Naylor C.J., Cavanagh D., 1998. *Dual infection of tracheal organ cultures and chicks with infectious bronchitis virus and avian pneumovirus*. In: International Symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry, Rauischholzhausen, Germany, 15-18 giugno 1998, pp. 97-195.
- Jones R.M., Ellis R.J., Cox W.J., Errington J., Fuller C., Irvine R.M., Wakeley P.R., 2011. *Development and Validation of RT-PCR Tests for the Detection and SI Genotyping of Infectious Bronchitis Virus and Other Closely Related Gammacoronaviruses Within Clinical Samples*. Transboundary and Emerging Diseases **58** (5): 411-420.
- Jordan F.T.W., 1995. "Bronchite Infettiva". In: Jordan F.T.W., *Patologia Aviaria*. Edizione italiana a cura di De Luca G. e Bertuzzi S., Edagricole, Bologna, 1995, pp. 149-155.
- Kamal R.P., Katz J.M., York I.A., 2014. *Molecular Determinants of Influenza Virus Pathogenesis in Mice*. Current topics in microbiology and immunology, DOI 10.1007/82_2014_388.
- Kant A., Koch G., van Roozelaar D.J., Kusters J.G., Poelwijk F.A., van der Zeijst B.A., 1992. *Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the SI*

- avian infectious bronchitis virus glycopolyptide*. Journal of General Virology **73** (Pt 3): 591-596.
- Kotani T., Shiraishi Y., Tsukamoto Y., Kuwamura M., Yamate J., Sakuma S., Gohda M., 2000. *Epithelial cell kinetics in the inflammatory process of chicken trachea infected with infectious bronchitis virus*. The journal of veterinary medical science, **62** (2): 129-134.
 - Kuo L., Godeke G.J., Raamsman M.J., Masters P.S., Rottier P.J., 2000. *Retargeting of Coronavirus by Substitution of the Spike Glycoprotein Ectodomain: crossing the Host cell Species barrier*. Journal of virology, **74** (3): 1393-1406.
 - Landman W.J.M., Dwars R.M., De Wit J.J. 2005. *High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection*. In:14° Congresso mondiale aviare, Istanbul, Turchia, 22-26 agosto 2005, p. 369.
 - Lemey P., Rambaut A., Welch J.J., Suchard M.A., 2010. *Phylogeography Takes a Relaxed Random Walk in Continuous Space and Time*. Molecular Biology and Evolution **27** (8): 1877-1885.
 - Listorti V., Lupini C., Cecchinato M., Pesente P., Rossi G., Giovanardi D., Naylor C.J., Catelli E., 2014. *Rapid detection of subtype B avian metapneumoviruses using RT-PCR restriction endonuclease digestion indicates field circulation of vaccine-derived viruses in older turkeys*. Avian Pathology, **43** (1): 51-56.
 - Loomis L.N., Cunningham C.H., Gray M.L., Thorp F., 1950. *Pathology of the chicken embryo infected with infectious bronchitis virus*. American Journal of Veterinary research, **11** (40): 245-251.
 - MacDonald J.W.e McMartin D.A., 1976. *Observations on the effects of the H52 and H120 vaccine strains of infectious bronchitis virus in the domestic fowl*. Avian Pathology, **5** (3): 157-173.
 - Malo A., Orbell S., Huggins M., Woods M., Cook J., 1998. *Cross protection studies after the use of liveattenuated IBV vaccines Nobilis IB 4-91 and Nobilis IB Ma5 (Massachusetts type)*. Intervet WSD Newsletter **17**: 1-6.
 - Markham F.S., Hammar A.H., Perry E.B., Tesar W.C., 1956. *Combined Newcastle disease-infectious bronchitis vaccines and the absence of the interference phenomena*. The Cornell Veterinarian **46** (4): 538-548.
 - Martin D.P., Lemey P., Lott M., Moulton V., Posada D., Lefevre P., 2010. *RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination*. Bioinformatics **26** (19), 2462-2463.

- Massi P., 2013. *Situazione epidemiologica della Bronchite Infettiva in Italia*. Rivista di Medicina Veterinaria, Speciale 2013, pp. 13-20.
- Massi P., Fiorentini L., Taddei R., Barbieri I., Tosi G., 2010. *Episodio di "false ovaiole" in galline ovaiole di 22 settimane di età in seguito ad infezione da virus della bronchite infettiva aviare denominato QXlike*. In: Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA) 2010: XLIX Convegno annuale, Forlì, Italia, 29-30 aprile 2010, pp.181-185.
- Mo M.L., Hong S.M., Kwon H.J., Kim I.H., Song C.S., Kim J.H., 2013. *Genetic diversity of spike, 3a, 3b and e genes of infectious bronchitis viruses and emergence of new recombinants in Korea*. Viruses, **5** (2): 550-567.
- Mondal S.P.e Naqi S.A., 2001. *Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection in infection and development of active immunity to vaccine*. Veterinary immunology and immunopathology, **79** (1-2): 31-40.
- Moreno A., Ceruti R., Boniotti B., Gavazzi L., Fasoli P., Cordioli P., 2014. *Circolazione di un nuovo genotipo di virus della Bronchite Infettiva aviaria in Italia*. In: Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA) 2014: LII Convegno annuale, Salsomaggiore Terme (PR), Italia, 8-9 maggio 2014, pp. 177-183.
- Mork A.K., Hesse M., Rahman S.A.E., Rautenschlein S., Herrler G., Winter C., 2014. *Differences in the tissue tropism to chicken oviduct epithelial cells between avian coronavirus IBV strains QX and B1648 are not related to the sialic acid binding properties of their spike proteins*. Veterinary Research, **45** (1): 67.
- Ndegwa E.N., Joiner K.S., Toro H., van Ginkel F.W., van Santen V.L., 2012. *The Proportion of Specific Viral Subpopulations in Attenuated Arkansas Delmarva Poultry Industry Infectious Bronchitis Vaccines Influences Vaccination Outcome*. Avian Diseases, **56**: 642-656.
- Okino C.H., Alessi A.C., Montassier M.de F.S., Rosa A.J.de M., Wang X., Montassier H.J., 2013. *Humoral and Cell-Mediated Immune Responses to Different Doses of Attenuated Vaccine Against Avian Infectious Bronchitis Virus*. Viral Immunology, **26** (4):1-9.
- Okino C.H., Montassier M.F.S.M., Givisiez P.E.N., Furuyama C.R.A.G., Brentano L., Montassier H.L., 2005. *Infectious Bronchitis Virus: Detection and Vaccine Strain Differentiation by Semi-nested RT-PCR*. Brazilian Journal of Poultry Science, **7** (1): 59-66.
- Pascucci S., 1998. *Bronchite infettiva aviaria* 7° Corso di formazione specialistica per veterinari in tecnica dell'allevamento avicolo e patologia aviaria, Brescia, Italia, 27 novembre 1998.

- Pascucci S., 2013. *Le basi dell'immunità e l'induzione della protezione*. Rivista di Medicina Veterinaria, Speciale 2013. pp. 31-36.
- Phillips J.E., Jackwood M.W., McKinley E.T., Thor S.W., Hilt D.A., Acevedo N.D., Williams S.M., Kissinger J.C., Paterson A.H., Robertson J.S., Lemke C., 2011. *Changes in nonstructural protein 3 are associated with attenuation in avian coronavirus infectious bronchitis virus*. Virus Genes, **44** (1):63-74.
- Pohjola L.K., Ek-Kommonen S.C., Tammiranta N.E., Kaukonen E.S., Rossow L.M., Huovilainen T.A., 2014. *Emergence of avian infectious bronchitis in a nonvaccinating country*. Avian Pathology, **43** (3): 244-248.
- Pond S.L.K., Frost S.D.W., Muse S.W., 2005. *HyPhy: hypothesis testing using phylogenies*. Bioinformatics **21** (5): 676-679.
- Ponti W., 2005. "Classificazione dei virus e virologia speciale". In: Poli G., Cocilovo A., Dall'Ara P., Martino P.A., Ponti W., 2005. *Microbiologia e immunologia veterinaria*. 2° edizione, UTET, Torino, pp. 486-489.
- Schalk A.F. e Hawn M.C., 1931. *An apparently new respiratory disease in baby chicks*. Journal of the American Veterinary Medical Association, **78**: 413-422.
- 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.
- Sesti L., Sara L., Alvarado L., Cortegana J., Orosco R., Romero Conde J.C., Cruz A., 2014. *Diagnostic, epidemiology and control of the Q1 IBV variant strain in Peru, Colombia, Argentina and Chile*. In: 8° International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens – Programme and abstracts, Rauschholzhausen, Germany, 17-20 giugno 2014.
- Springer W.T., Luskus C., Pourciau S.S., 1974. *Infectious bronchitis and mixed infectious of Mycoplasma synoviae and Escherichia coli in Gnotobiotic chickens. I. Synergistic role in the airsacculitis syndrome*. Infection and Immunity, **10** (3): 578.
- Stooker L., Mer Van C., Andrews S., Wijmenga W., Vancraeynest D., 2011. *Pan-European survey on the distribution of different strains of Infectious Bronchitis virus in 2011*. In: Book of abstracts, XVIII Congresso World Veterinary Poultry Association French branch (WVPA), Nantes, Francia, 19-23 agosto 2013, p. 383.
- Sukupolvi-Petty S., Brien J.D., Austin S.K., Shrestha B., Swayne S., Kahle K., Doranz B.J., Johnson S., Pierson T.C., Fremont D.H., Diamond M.S., 2013. *Functional analysis of*

- antibodies against dengue virus type 4 reveals strain-dependent epitope exposure that impacts neutralization and protection. Journal of Virology* **87** (16): 8826-8842.
- Sun C., Han Z., Ma H., Zhang Q., Yan B., Shao Y., Xu J., Kong X., Liu S., 2011. *Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains. Avian Pathology*, **40** (1): 43-54.
 - Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution*, **30** (12): 2725-2729.
 - Terregino C., Toffan A., Beato M.S., De Nardi R., Vascellari M., Meini A., Ortali G., Mancin M., Capua I., 2008. *Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chicken , and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. Avian Pathology*, **37** (5): 487-493.
 - Toffan A., Bonci M., Bano L., Valastro V., Vascellari M., Capua I., terregino C., 2013. *Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. Veterinaria italiana*, **49** (4): 3347-355.
 - Toffan A., Terregino C., Mazzacan E., Castaldello I., Capua I., Bonci M., 2011. *Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. Veterinary Record*, **169** (8): 212-213.
 - Tosi G., 2013. *Bronchite Infettiva: i principi della patogenesi. Rivista di Medicina Veterinaria, speciale 2013*, pp. 5-12.
 - Valastro V., Monne I., Fasolato M., Cecchetin K., Parker D., Terregino C., Cattoli G., 2010. *QX-type infectious bronchitis virus in commercial flocks in the UK. Veterinary Record*, **167** (22): 865-866.
 - Van Roekel H., Bullis K.L., Clarke M.K., Olesiuk O.N., Sperling F.G., 1950. *Infectious bronchitis. Bulletin of the Massachusetts Agricultural Experiment Station* **460**: 1-47.
 - Wang H.N., Wu Q.Z., Huang Y., Liu P., 1998. *Isolation and Identification of Infectious Bronchitis Virus from Chickens in Sichuan, China. Avian Diseases*, **41**: 279-282.
 - Winterfield R.W. e Hitchner, 1962. *Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. American Journal of Veterinary Research*, **23**: 1273-1278.
 - Winterfield R.W., 1984. *Vaccination of chickens with Newcastle disease and infectious bronchitis vaccines administered singly and in combination. Poultry Science*, **63** (1): 182-184.

- Winterfield R.W. e Albassam M.A., 1984. *Nephropathogenicity of infectious bronchitis virus*. Avian Pathology, **63** (12): 2358-2363.
- Worthington K.J. e Jones R.C. 2006. *An update in the European RT-PCR IBV survey and recent findings on a novel IBV genotype*. In: 5° International Symposium about Avian Corona and Pneumovirus infections, Rauschholzhausen, Germany, pp. 176-188.
- Worthington K.J., Currie R.J.W., Jones R.C., 2008. *A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006*. Avian Pathology, **37** (3): 247-257.
- Worthington K.J., Savage C., Naylor C.J., Wijmenga W., Jones R.C., 2004. *An RT-PCR survey of infectious bronchitis virus genotypes in the UK and selected European countries between 2002 and 2004 and the results from a vaccine trial*, 4° Symposium about Avian Corona and Pneumovirus infections, Rauschholzhausen, Germany, pp. 125-133.
- Yu L., Jiang Y., Low S., Wang Z., Nam S.J., Liu W., Kwangac J., 2001. *Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens*. Avian diseases, **45** (2): 416-424.

Siti Internet consultati

- <http://partnersah.vet.cornell.edu/avian-atlas/search/disease/497> (consultato il 25/07/2014)
- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/enz.php?name=0d8c2d3b-&enzname=NruI>
(consultato il 10/09/2014)
- <http://viralzone.expasy.org> (consultato il 3/08/2014)
- <http://www.fipv.ugent.be/index.html> (consultato il 5/08/2014)
- <http://www.fipv.ugent.be/page2/page2.html> (consultato il 20/07/2014)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (consultato il 25/08/2014)
- www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (consultato il 25/08/2014)

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo lavoro, desidero innanzitutto esprimere la mia sincera gratitudine al Dott. Cecchinato Mattia, per la costante disponibilità e il grande sostegno dimostratomi durante la stesura di questa tesi.

Ringrazio vivamente il Dott. Franzo Giovanni, per la grande pazienza e competenza con cui mi ha seguito durante le fasi sperimentali di questo lavoro e per il continuo aiuto dimostratomi.

Un sentito ringraziamento all'intero personale del laboratorio di Malattie Infettive, che mi ha seguito in questo periodo di lavoro.

Un pensiero speciale va alla mia famiglia, per il grande sostegno che mi ha saputo dare in questi anni di studio e per avermi sempre incoraggiata nelle situazioni più impegnative.

Un sincero ringraziamento ai miei compagni di Corso, in particolare ad Alberto B., a Giulia, al mio gruppo di tirocinio e a tutti coloro che mi sono stati vicini e con i quali ho condiviso le tante giornate di studio e fatica, oltre che i molti momenti di spensieratezza e gioia.

Ringrazio anche Chiara, mia grande amica da sempre; Benedetta, mia fidata compagna di banco al Liceo e Francesca M., amica da molti anni.

Uno speciale ringraziamento va ad Alberto, per il grande aiuto che mi ha dato nella composizione di questa tesi, ma soprattutto per l'insostituibile appoggio e incoraggiamento durante i momenti più difficili e per esserci sempre.

Infine un sentito ringraziamento va a tutti gli amici e conoscenti che non ho nominato, ma che ugualmente mi hanno accompagnato in questo lungo percorso di studi.