

## COMUNICAZIONE 15

## UTILIZZO DI UN VACCINO ETEROLOGO NEI CONFRONTI DELL'INFLUENZA AVIARIA COME VACCINO "MARKER": PROVA DI CROSS-PROTEZIONE E VALIDAZIONE PRELIMINARE DEL TEST DISCRIMINATORIO

G. Cattoli<sup>1</sup>, C. Terregino<sup>1</sup>, V. Brasola<sup>1</sup>, J.F. Rodriguez<sup>2</sup>, A. Zuin<sup>1</sup>, I. Capua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Virologia Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy <sup>2</sup>Centro Nacional de Biotecnologia, Cantonblanco, Madrid, Spagna

Parole chiave: cross-protezione, influenza aviaria, vaccino marker

### Cross-protection studies against HPAI of the H7N1 subtype using a heterologous H7N3 strain as a marker vaccine and development and preliminary validation of a serological discriminatory test

Key words: cross-protection, avian influenza, marker vaccine

**Summary:** The present paper reports the results of the laboratory investigations performed to evaluate the use of an inactivated vaccine containing a heterologous strain, possessing a different neuraminidase as a "marker vaccine" for the control of avian influenza. The clinical results of the challenge experiment performed using the inactivated vaccine containing the A/Ck/Pakistan/95/H7N3 strain of avian influenza against the Italian A/ty/Italy/4580/V99 HPAI virus, and the development and preliminary validation of a discriminatory test using a recombinant N1 protein are reported. The heterologous vaccine was able to induce a clinical protection of 93% regardless of the vaccination scheme used. Indirect immunofluorescence was used as the discriminatory test, and the preliminary results indicate that it was able to detect all infected (N1) positive groups. No false positives were recorded in sera negative to avian influenza, but 11% of false positive sera were recorded among the H7N3 vaccinated birds.

Correspondence: Ilaria Capua, Laboratorio Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Romea 14/A 35020, Legnaro, PD; email [icapua@izsvenezie.it](mailto:icapua@izsvenezie.it)

#### Introduzione

L'Influenza aviaria (IA) è una malattia altamente contagiosa dei volatili sostenuta da *Orthomyxovirus* di tipo A. Questa malattia è in grado di causare ingenti danni economici (diretti ed indiretti) all'allevamento avicolo intensivo e per questo è stata inclusa nella Lista A dell'Office International des Epizooties, (OIE) che comprende le malattie altamente diffusive degli animali.

Come per altre malattie infettive presenti nella lista A dell'OIE, la vaccinazione è vietata nei paesi dell'Unione Europea (UE) (2), onde evitare l'interferenza con i piani di siero-sorveglianza ed eradicazione. La possibilità quindi di poter disporre di vaccini marker che rendano agevole la distinzione tra animali vaccinati ed animali infetti risulterebbe di notevole utilità. Le moderne tecniche di ingegneria genetica hanno portato allo sviluppo di vaccini vivi ingegnerizzati, i quali hanno inevitabilmente incontrato grossi ostacoli in fase di registrazione.

Nel corso del 1999/2000 l'Italia settentrionale è stata colpita da una grave epidemia influenzale causata dal sierotipo H7N1 che ha portato alla morte o al depopolamento di circa 14 milioni di volatili allevati intensivamente, principalmente tacchini e polli (1). Come *ultima ratio* nel controllo dell'epidemia si è dovuto ricorrere ad una profilassi vaccinale e, alla luce delle considerazioni sopra esposte, si è fatto ricorso all'utilizzo di un vaccino convenzionale inattivato di facile produzione, contenente un ceppo influenzale eterologo H7N3. Tale scelta è derivata dalla consapevolezza che la proteina dell'emoagglutinina è responsabile della produzione di anticorpi neutralizzanti (3), e che quindi qualunque virus H7 è in grado di stimolare la sintesi di anticorpi protettivi. La neuraminidasi (N) eterologa, avrebbe pertanto le potenzialità di essere sfruttata come *marker* naturale.

Nel presente lavoro si riportano i risultati clinici delle prove di cross-protezione *in vivo* fra il virus HPAI H7N1 ed il vaccino eterologo H7N3, e la messa a punto di un test sierologico discriminatorio, in grado di distinguere fra i soggetti infetti ed i soggetti vaccinati.

#### Materiali e metodi

**Prova di cross protezione *in vivo*:** La protezione indotta dal vaccino eterologo inattivato H7N3 è stata valutata in polli SPF sottoposti a due schemi vaccinali diversi mediante *challenge* con il virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99 come riportato di seguito. La prova è stata effettuata in isolatore, i soggetti sono stati alimentati con acqua e mangime *ad libitum*.

**Gruppi sperimentali:** Gruppo 1: 13 polli SPF vaccinati per via intramuscolare con dose singola di vaccino a 3 settimane età. Gruppo 2: 13 polli SPF vaccinati per via intramuscolare con singola dose a 2 ed a 4 settimane di età. Gruppo 3: 10 polli SPF, controllo non vaccinato, sottoposto a *challenge*, Gruppo 4: 10 polli SPF non vaccinati e non sottoposti a *challenge*.

Tutti i soggetti sono stati salassati a sei settimane di età per la valutazione del titolo sierologico mediante prova di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) (2). Successivamente sono stati sottoposti a *challenge* mediante instillazione oculo-congiuntivale di 10<sup>7,5</sup> EID<sub>50</sub> del virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99, ed osservati giornalmente allo scopo di rilevare la presenza di sintomatologia clinica riferibile ad influenza aviaria ad alta patogenicità, per un periodo di 2 settimane.

**Messa a punto del test discriminatorio basato sulla ricerca degli anticorpi anti-N1.** Il test si è basato sulla espressione della proteina N1 in un sistema di espressione baculovirus e del suo utilizzo come antigene. In breve, il gene codificante la proteina N1 del ceppo responsabile dell'epidemia è stato amplificato mediante RT-PCR, e clonato in vettori di espressione baculovirus (Bac-to-Bac System, Invitrogen Life Technologies). Cellule di insetto

*Tricoplosia ni* (High Five Cells, Invitrogen Life Technologies) sono state infettate con il baculovirus ricombinante ed utilizzate come antigene per la messa a punto di un test di immunofluorescenza indiretta (IFI) su micropiastra a 96 pozzetti. Sono stati complessivamente saggiati 38 gruppi di tacchini di cui 14 sierologicamente negativi all'antigene H7, 12 sierologicamente positivi H7N1 (infetti) e 24 sierologicamente positivi H7N3 (vaccinati) per un totale di 587 sieri di campo.

#### Risultati

Prova di cross-protezione *in vivo*: I risultati della prova di cross *protezione in vivo* sono riportati nella Tabella 1. Dei 13 soggetti vaccinati con unica somministrazione (Gruppo 1), un solo soggetto è venuto a morte, con sintomi e lesioni caratteristiche dell'influenza aviaria ad alta patogenicità. Questo soggetto presentava un titolo sierologico inibente l'emoagglutinazione *pre-challenge* di 1:4. In maniera analoga, dei 13 soggetti vaccinati 2 volte (Gruppo 2), un soggetto è venuto a morte in terza giornata con lesioni riferibili ad influenza aviaria ad alta patogenicità. Questo soggetto non presentava alcun titolo sierologico *pre-challenge* alla prova di inibizione dell'emoagglutinazione. Tutti i soggetti non vaccinati e sottoposti a challenge sono venuti a morte nell'arco di 4 giorni.

Messa a punto del test discriminatorio basato sulla ricerca degli anticorpi anti-N1.

I risultati della validazione preliminare del test di immunofluorescenza indiretta indicano che il test è stato in grado di individuare il 100% dei gruppi infetti. Nell'ambito dei sieri sierologicamente negativi all'antigene H7, non si sono verificate delle false positività, mentre nell'ambito dei sieri ottenuti dai soggetti vaccinati il test ha evidenziato l'11% di falsi positivi.

#### Discussione

**Tabella 1:** Risultati clinici della prova di *challenge* nei confronti del virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99 effettuata su soggetti vaccinati e non, con il vaccino eterologo A/ck/Pakistan/95/H7N3

**Table 1:** Clinical results of the challenge trial against the virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99 performed in non vaccinated and vaccinated birds with the heterologous vaccine A/ck/Pakistan/95/H7N3

	Gruppo 1 (1 intervento vaccinale)	Gruppo 2 (2 interventi vaccinali)	Gruppo 3 (non vaccinato sottoposto a challenge)	Gruppo 4 (controllo)
<b>Numero animali</b>	13	13	10	10
<b>Totale morti nel periodo di osservazione</b>	1	1	10	0
<b>Indice di protezione</b>	93%	93%	0	-

Da quanto sopra esposto, risulta che tutti e due gli schemi vaccinali utilizzati, basati sull'utilizzo di un vaccino eterologo inattivato contenente il ceppo A/Ck/Pakistan/95/H7N3, hanno determinato un indice di protezione del 93% nei confronti del challenge con virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99. La mortalità osservata in un soggetto del Gruppo 1 ed in un soggetto del Gruppo 2 è verosimilmente da correlare al titolo sierologico non protettivo che presentavano i soggetti venuti a morte.

I risultati della validazione preliminare della prova per la ricerca degli anticorpi anti-N1 indicano un'ottima capacità di svelare la presenza di gruppi infetti. Rimane da determinare se i falsi positivi (evidenziati nell'ambito dei soggetti vaccinati) sono da ricondurre a cross-reazioni N1-N3 oppure ad altre cause, come ad esempio la circolazione di altri ceppi di virus influenzali N1.

I risultati della sperimentazione indicano che l'utilizzo di un vaccino inattivato, con emoagglutinina dello stesso gruppo e neuraminidasi eterologa è una strategia percorribile per il controllo dell'influenza aviaria, ottenendo da un lato una buona protezione clinica e nel contempo la possibilità di differenziare i soggetti vaccinati dai soggetti infetti.

#### Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Serafino (Berto) Pianta per l'effettuazione delle prove di challenge in isolatore.

#### Bibliografia

- 1) Capua I., Marangon S. (2000). The avian influenza epidemic in Italy (1999-2000): a review. *Avian Pathol* 29, 289-294
- 2) CEC. (1992) Council Directive 92/40/EEC of 19 May 1992 introducing Community measures for the control of avian influenza. *O. J. of the European Commission* L167, 1-15.
- 3) Suarez DL., Schultz Cherry S. (2000). Immunology of avian influenza virus: a review. *Develop Comp Immunol* 24, 269-283