

COMUNICAZIONE 16

PROVA DI CROSS-PROTEZIONE NEI CONFRONTI DELLA VARIANTE BRONCHITE INFETTIVA 624/I UTILIZZANDO VACCINI COMMERCIALI CONTENENTI LE VARIANTI M41 E 793/B

C. Terregino, V. Brasola, B. Tramontan, D. Buson, F. Montesi, I. Capua
 Laboratorio Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy

Parole chiave: cross-protezione, bronchite infettiva, variante 624/I

Cross-protection studies against the Italian infectious bronchitis variant 624/I using commercially available vaccines containing the M41 and 793/B serotypes

Key words: cross-protection, infectious bronchitis, variant 624/I, commercial vaccines

Summary. A cross-protection study for the Italian infectious bronchitis variant 624/I was performed in SPF birds administered with commercial live vaccines containing the 793/B and M41 serotypes of infectious bronchitis. The degree of protection induced by different vaccination schemes was assessed by evaluating the degree of ciliostasis induced by the challenge virus on the tracheal epithelium and by scanning electron microscopy. A good degree of local protection was obtained in tracheal organ cultures with the H120-793/B scheme, while a lower degree of protection was achieved with the H120-Ma5 scheme. These results were confirmed by scanning electron microscopy. Further investigations are in progress to establish whether protection at the tracheal level is sufficient to prevent viraemia and colonization of target organs.

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

Introduzione

Il virus della bronchite infettiva (IB) è un *Coronavirus*, prototipo della famiglia *Coronaviridae*. È un virus pleomorfo, di 90-200 nm di diametro, con genoma RNA a singolo filamento.

Utilizzando il test di virus-neutralizzazione sono stati identificati numerosi sierotipi, diversi sotto il profilo antigenico, ma tutti con alcune componenti antigeniche comuni. Tra i sierotipi "storici" sono da ricordare il Massachusetts ed il Connecticut, i quali prediligono il tratto respiratorio, mentre i sierotipi T, Gray e Holte sono prevalentemente nefrotropici.

Negli ultimi anni sono state isolate e caratterizzate diverse nuove varianti in Europa (1,7,8,10), mentre altre sembrano persistere ormai da diverso tempo (4) ed altre ancora sembrano riemergere dopo diversi anni (6).

In Italia la malattia è presente sia negli allevamenti di broiler (con forme morbose respiratorie e renali) che negli allevamenti di ovaiole e di riproduttori pesanti. Nel nostro paese circolano ceppi diversi tra cui l'M41, il 793/B (CR88 o UK 4-91), il ceppo nefropatogeno belga B1648 e le varianti italiane FA 6881 e 624/I (2,10). Quest'ultimo sierotipo è stato isolato da focolai diagnosticati in varie regioni italiane negli ultimi anni. Vaccini efficaci contro la bronchite sono disponibili in commercio già dagli anni '50. Nonostante il loro largo impiego, la bronchite infettiva rimane ancora uno dei principali problemi per l'allevamento avicolo a motivo principalmente della variabilità antigenica dell'agente eziologico.

In particolare la proteina S è risultata estremamente variabile, specie la subunità S1. Numerosi sierotipi noti differiscono tra di loro anche per più del 20% degli aminoacidi di questa proteina (9). Altri nuovi sierotipi possono invece essere il risultato del cambiamento di pochissimi aminoacidi della subunità S1 (3) mentre altri epitopi rimangono invariati. Poiché diversi antigeni sono in comune tra i numerosi ceppi conosciuti è probabile che uno stesso vaccino possa risultare protettivo verso differenti sierotipi. È stato infatti dimostrato (5) che la duplice vaccinazione con vaccino

IB vivo M41 al primo giorno di vita e 793/B a due settimane di età induce una buona protezione nei confronti di alcuni dei principali sierotipi IBV che attualmente causano problemi di bronchite infettiva (5).

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare se l'immunità indotta da programmi vaccinali contenenti le varianti M41 e 793/B sono in grado di proteggere il pollo verso una infezione sperimentale con la variante 624/I.

Materiali e metodi

Animali utilizzati per la prova. Pulcini white leghorn SPF schiusi in isolatore. Gli animali sono stati alimentati con mangime e acqua *ad libitum*.

Virus di challenge. IB virulento, ceppo 624/I isolato da un focolaio di bronchite infettiva.

Vaccini. *Nobilis IB H120*, vaccino vivo liofilizzato contro la Bronchite infettiva ceppo M41 $\geq 10^{4.5}$ EID₅₀/dose. *Nobilis IB Ma5*, vaccino vivo liofilizzato contro la Bronchite infettiva ceppo M41 $\geq 10^3$ EID₅₀/dose. *Nobilis IB 4-91*, vaccino vivo liofilizzato contro la bronchite infettiva ceppo 4-91 (793/B) $\geq 10^{3.6}$ EID₅₀/dose.

Protocollo di challenge. 40 pulcini SPF sono stati inanellati, suddivisi in 4 gruppi ed accasati in 4 isolatori differenti in ragione di 10 pulcini per isolatore:

Gruppo 1V: pulcini vaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB H120* al primo giorno di vita e rivaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB 4-91* a 14 gg. di vita;

Gruppo 2CV: pulcini vaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB H120* al primo giorno di vita e rivaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB Ma5* a 18 gg. di vita;

Gruppo 3CNVCh: pulcini di controllo non vaccinati, sottoposti a *challenge*;

Gruppo 4CNV: pulcini di controllo non vaccinati e non sottoposti a *challenge*.

All'età di 5 settimane i soggetti appartenenti ai tre gruppi 1V, 2CV e 3CNVCh sono stati infettati sperimentalmente con 100 μ l di una sospensione virale del virus di *challenge* ceppo 624/I, alla dose di log₁₀ 3.0 MCD (Dose Ciliostatica 50) somministrato per via oculo-nasale. Tutti i soggetti dei tre gruppi

sono stati tenuti sotto controllo per la durata dell'esperimento per evidenziare eventuali sintomi clinici riferibili a bronchite infettiva.

Quattro soggetti per gruppo sono stati sacrificati mediante somministrazione intravenosa di ketamina il quarto e settimo giorno dopo il *challenge*.

Valutazione della protezione *in vivo*. La valutazione dell'indice di protezione è stata effettuata valutando il grado di ciliostasi presente nelle trachee dei soggetti provenienti dai vari gruppi (5). In breve, da ogni trachea sono stati ottenuti e messi in coltura 10 anelli tracheali. A ciascun anello è stato dato un punteggio da 0 a 4 secondo la seguente scala:

0: motilità ciliare del 100%; 1: motilità ciliare del 75 %; 2: motilità ciliare del 50 %; 3: motilità ciliare del 25 %; 4: motilità ciliare assente (100% di ciliostasi).

L'indice di protezione per ciascun gruppo è stato calcolato dalla seguente formula: $(1 - \text{media del punteggio di ciliostasi del gruppo vaccinato ed infettato} / \text{media del punteggio di ciliostasi del gruppo di controllo infettato}) \times 100$. Inoltre, il danno ciliare causato dal virus di *challenge* e le differenze tra i gruppi sperimentali sono state valutate mediante esame al microscopio elettronico a scansione. Campioni di trachea di circa un centimetro e mezzo di lunghezza sono stati prelevati da ciascun soggetto a livello del terzo prossimale dell'organo, sezionati medialmente ed immediatamente fissati in glutaraldeide al 25% ed in tampone cacodilato per 2-4 ore. Successivamente, i frammenti sono stati lavati in tampone cacodilato, disidratati in alcoli ascendenti, e successivamente disidratati sotto pressione (critical point drying). I preparati sono stati quindi ricoperti con un film di carbone e preparati per la lettura al SEM (Cambridge) a 20Kv.

Risultati

Dalla prova di cross-protezione *in vivo* è emersa una buona protezione locale a livello dell'epitelio tracheale negli animali vaccinati ad un giorno con Nobilis IB H120 e a 14 giorni con il vaccino Nobilis IB 4-91 (contenente il sierotipo 793/B). In questo gruppo l'indice di protezione è stato del 91%. Un grado di protezione minore (45%) è stato ottenuto nei soggetti vaccinati con Nobilis IB H120 e richiamati con Nobilis IB Ma5 (Tabella 1).

L'esame della mucosa tracheale al microscopio elettronico a scansione ha confermato i risultati ottenuti dall'osservazione a fresco degli anelli tracheali. Le immagini relative alla trachea degli animali vaccinati con lo schema vaccinale H120-793/B hanno mostrato infatti una sostanziale integrità dell'epitelio respiratorio, nonostante qualche segno di reazione infiammatoria e di riduzione della clearance ciliare. Marcata è stata comunque la differenza rispetto al gruppo in cui è stato utilizzato il vaccino Ma5 e soprattutto rispetto al gruppo di controllo non vaccinato e sottoposto al *challenge*. Nel gruppo 2CV infatti, si sono osservate zone con assenza di ciglia, disorientamento ciliare, apici delle ciglia uniti tra loro dal muco ed ipertrofia delle cellule caliciformi.

Nel gruppo 3 CNVCh le lesioni osservate sono state molto più gravi e sono state caratterizzate da

disepitelizzazione, perdita delle ciglia e presenza di zone di erosione sulla mucosa.

Discussione

L'integrità dell'epitelio respiratorio e la conservazione della funzionalità della clearance ciliare, confermata anche dalle foto al microscopio elettronico a scansione, rappresentano sicuramente una valida barriera al virus di campo e ad agenti opportunisti secondari. Rimane da determinare se questa integrità è sinonimo di assenza di viremia e di colonizzazione degli organi bersaglio. Infatti, l'immunità locale a livello tracheale potrebbe non rappresentare l'unico fattore in grado di impedire la viremia, e, ad esempio la colonizzazione renale. Sono in corso prove tese alla ricerca dell'antigene virale negli organi bersaglio mediante metodiche di immunostochimica.

E' opportuno comunque sottolineare che, in assenza di un presidio specifico per la variante 624/I, ed in considerazione dei gravi danni che questo virus provoca in campo, l'impiego della vaccinazione combinata H120 - 793/B, risulterebbe se non altro utile in caso di circolazione attiva del virus variante 624/I.

Bibliografia

- 1) Capua I., Gough R.E., Mancini M., Casaccia C., Weiss C. (1993). A "novel" infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. J. Vet. Med. Ser. B, 41, 83-89.
- 2) Capua I., Mawditt K., Cavanagh D., Gough R.E. (1999) Serological and molecular characterisation of infectious bronchitis virus strains isolated between 1996 and 1997 in Italy. Atti 37° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì 1-2 Ottobre 1998 Sel. Vet. (8/9) 639-644
- 3) Cavanagh D., Davis P.J., Cook J.K.A. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. Avian Pathology, 21, 401-408
- 4) Cislighi G., Martino B.A., Zanella A. (1997) Bronchite infettiva aviaria : persistenza nel nostro paese del virus nefropatogeno sierotipo AZ 23/74. Atti 35° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì 25-26 Settembre 1997 Sel. Vet., (8/9) 597-605
- 5) Cook J.K.A., Orbell S.J., Woods M.A., Huggins M.B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathology , 28, 477-485
- 6) Gough R.E., Cox W.J., Gutierrez E. MacKenzie G., Wood A.M., Dagless M.D. (1996) Isolation of "variant" strains of infectious bronchitis virus from vaccinated chickens in Great Britain. Veterinary Record, 139, 552
- 7) Gough R.E., Randall C.J., Dagless M.D., Alexander D.J., Cox W.J., Pearson D. (1992) A " new" strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Veterinary Record 130, 493-494
- 8) Parson D., Ellis M.M., Cavanagh D., Cook J.K.A. (1992) Characterisation of an infectious bronchitis virus from vaccinated broiler breeders. Veterinary Record. 131, 408-411
- 9) Pascucci S. (1995) Alcune considerazioni sulla bronchite infettiva e la sua evoluzione in Italia. Atti del convegno: "Bronchite infettiva: Un problema in evoluzione. Sierotipi italiani e problemi di campo". Bologna 12 settembre 1995
- 10) Zanella A., Coaro R., Fabris G., Marchi R., Lavazza A. (2000) Avian infectious bronchitis: isolation of apparently new variant in Italy. Veterinary Record 146, 191-193

Tabella 1: Risultati della prova di cross protezione *in vivo*

Table 1: results of *in vivo* cross protection trial

	H120 ad 1 giorno di vita + IB 4/91 a 14 giorni di vita			H120 ad 1 giorno di vita + Ma5 a 18 giorni di vita			Controllo non vaccinato sottoposto a <i>challenge</i>		
	Media del punteggio di ciliostasi	% di animali protetti	Indice di protezione	Media del punteggio di ciliostasi	% di animali protetti	Indice di protezione	Media del punteggio di ciliostasi	% di animali protetti	Indice di protezione
4° gg. PI	1,75	100	-	19	75	-	20,25	25	-
7° gg. PI	3,25	100	-	12	75	-	36	0	-
Totale	2,50	100	91,1	15,5	75	45	28,1	12,5	0