

COMUNICAZIONE 12

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA E DELL'INNOCUITA' DELLA VACCINAZIONE PER IL VAIOLO NEL CANARINO (*SERINUS CANARIUS*)

C. Terregino¹, I. Capua¹, F. Mutinelli², A. Toffan¹

¹Laboratorio di Virologia, ²Laboratorio di Istopatologia
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

Parole chiave: canarino, vaiolo aviario, vaccinazione, efficacia, sicurezza

Evaluation of efficacy and security of live vaccine for canary-poxvirus

Key words: canary, avian pox, vaccination, efficacy, safety

Summary: Avian pox is one of the most important disease in canary. In this species is very common the septicemic form of the disease and birds of any age are susceptible. The mortality rates in the flock usually is very high. Canary pox infections can be prevented by using a specific commercially available attenuated-live vaccine. In the present paper the vaccine Poulvac® Canary pox (Fort Dodge) was tested in order to assess its efficacy and safety. The data obtained show that the vaccine is safe and able to prevent the disease in the challenged birds.

Correspondence: Calogero Terregino, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD) e-mail virologia@izsvenezie.it

Introduzione

Uno dei problemi infettivi più gravi per l'allevamento del canarino è rappresentato dal diftero-vaiolo aviario. E' una malattia ampiamente distribuita in tutto il mondo causata da *Avipox* appartenenti alla sottofamiglia delle *Chordopoxvirinae* e alla famiglia dei *Poxviridae*. Nel genere *Avipox* sono comprese attualmente almeno 10 specie di virus ben definite identificate soprattutto dalla specie ospite, più altre in via di classificazione. Ci sono almeno 4 specie di virus del diftero-vaiolo che interessano le specie domestiche: ceppo pollo, ceppo tacchino, ceppo piccione e ceppo canarino, mentre ci sono molti altri *Avipoxvirus* in grado di infettare numerose altre specie di volatili. Più precisamente sono state segnalate infezioni spontanee in più di 60 specie appartenenti a 20 famiglie. Recentemente sono stati segnalati casi di diftero-vaiolo aviario in 209 specie di uccelli domestici e selvatici appartenenti a 22 ordini diversi, si ritiene comunque che tutti i volatili siano sensibili alla malattia (1). Il vaiolo nel canarino è stato segnalato per la prima volta nel 1930. La malattia in questa specie è sostenuta da un *Avipoxvirus* specifico indicato appunto come poxvirus del canarino o *canary-poxvirus*. I canarini sono, infatti, molto sensibili ai poxvirus del canarino ma sono resistenti a quelli del pollo, del tacchino e del colombo. Studi di cross-neutralizzazione indicano che il poxvirus del canarino è antigenicamente correlato a quello del pollo, tuttavia il *canary-poxvirus* è in grado di provocare solo lievi lesioni cutanee in polli e tacchini infettati sperimentalmente (4). La caratterizzazione del genoma mediante l'analisi delle endonucleasi di restrizione ha inoltre permesso di evidenziare che il poxvirus del canarino presenta spiccate differenze rispetto al poxvirus del pollo. Il vaiolo può essere considerato ormai una malattia endemica negli allevamenti di canarini dove ogni anno colpisce soggetti di ogni classe di età con gravi perdite. La mancanza di un vaccino specifico ha, infatti, reso la popolazione di canarini totalmente scoperta da un punto di vista immunitario, per cui si assiste a tutt'oggi ad una forte diffusione di questa patologia virale nelle sue diverse forme. La trasmissione può avvenire in maniera diretta o indiretta. Quest'ultima è mediata da artropodi vettori (principalmente zanzare) e pertanto si hanno incrementi di focolai in estate ed in zone dove

tali vettori sono particolarmente numerosi. Nel canarino il vaiolo si presenta in tre forme: la forma cutanea caratterizzata dalle tipiche lesioni vaiolose particolarmente evidenti nelle aree sprovviste di penne (palpebre, commessura del becco, zampe), la forma differica dove si osservano pseudomembrane biancastre sulla mucosa orale, sulla lingua, sulla volta del palato e sulla rima laringea e la forma generalizzata. Questa è una forma che colpisce frequentemente i canarini, nei quali si osserva polmonite desquamante con occlusione dei capillari aerei e fenomeni degenerativi epatici (2). Per la profilassi di tale malattia è importante porre in atto tutte le misure idonee ad evitare l'ingresso di portatori (passeriformi selvatici) o insetti vettori in allevamento. Tuttavia, se applicata correttamente e con presidi immunizzanti sicuri ed efficaci, la vaccinazione rimane l'arma di profilassi più efficace. Scopo della presente sperimentazione è stato quello di valutare l'efficacia e la sicurezza del Poulvac® Canary Pox al fine di permetterne la registrazione in Italia. Il Poulvac® Canary Pox è un vaccino vivo liofilizzato indicato per l'immunizzazione dei canarini (*Serinus canarius*) contro l'infezione sostenuta dal virus del vaiolo del canarino (*canary-poxvirus*).

Materiali e metodi

Sia per la sicurezza, sia per l'efficacia sono state seguite le linee guida della Farmacopea Europea (3) (F.E.).

Valutazione dell'efficacia La protezione data dalla vaccinazione con il Poulvac® Canary Pox è stata valutata mediante *challenge* con virus del vaiolo del canarino (*canary-pox*) altamente patogeno. Il ceppo utilizzato, BS L.69, è stato fornito dalla Sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Sono stati utilizzati trenta canarini, venti di questi soggetti sono stati sottoposti a vaccinazione secondo la modalità raccomandata dalla ditta produttrice del vaccino, ossia tramite puntura a livello della superficie inferiore della plica alare, mentre altri dieci hanno formato il gruppo di controllo. Ventuno giorni dopo la vaccinazione tutti i canarini sono stati infettati per via follicolare, a livello della cute del dorso, con il virus patogeno. I canarini sono stati sottoposti a visita clinica quotidiana. Gli

animali sono stati tenuti sotto osservazione per ventuno giorni dopo il *challenge*, i soggetti deceduti sono stati sottoposti ad esame necroscopico durante il quale sono stati prelevati campioni d'organi (cute, fegato, polmoni) per gli esami istologici e virologici.

Valutazione della sicurezza

Secondo la F.E. la sicurezza nella somministrazione di un sovradosaggio va eseguita con una dose vaccinale dieci volte superiore a quella normalmente utilizzata. Sono stati utilizzati per il test 10 canarini. Per la vaccinazione si è proceduto in questo modo:

- Ricostituzione del vaccino (flacone da 50 dosi + 0,5 ml di diluente) con 1/5 di diluente (100 µl) in modo da ottenere una sospensione virale 5 volte più concentrata di quella d'uso.
- Somministrazione di tale sospensione virale in entrambe le pliche alari (vaccinazione doppia)

La valutazione clinica delle lesioni è stata effettuata a 7, 15 e 21 giorni post-infezione (p.i.). Il test viene giudicato valido se nessuno dei canarini vaccinati mostra sintomi clinici o lesioni riferibili a vaiolo aviare (lesioni cutanee o membrane differiche a livello della mucosa del cavo orale e delle prime vie respiratorie) o muore per cause attribuibili all'infezione da virus vaccinale.

Valutazione del rischio di rivirulentazione nel canarino e nel pollo (*Gallus gallus*)

In questa fase è stato somministrato il vaccino per puntura alare ad un primo gruppo di 5 canarini e a 2 gruppi di 5 polli *White Leghorn* di 10 e 30 giorni d'età e si è atteso il formarsi della lesione nel sito di inoculo (indice dell'attecchimento del virus, in genere dopo 7 giorni le lesioni sono ben evidenti). È stato quindi fatto un pool delle lesioni cutanee dei 5 soggetti che sono state omogenate e risospese in 1 ml di soluzione salina tamponata (PBS) antibiotata. Tale sospensione è stata inoculata mediante puntura alare in altri 5 canarini e 5 polli della stessa età in modo da permettere al virus di replicarsi nuovamente in altri ospiti recettivi e provocare nel punto di inoculo lesioni simili a quelle viste nel passaggio precedente. Sono stati quindi eseguiti 5 passaggi e ad ogni passaggio si è verificato la presenza di lesioni attribuibili ad infezione vaiolosa. Il test si considera superato nel caso in cui non si ha un incremento della virulenza del virus vaccinale e le lesioni osservate al 5° passaggio sono simili a quelle osservate al 1° passaggio.

Risultati

Efficacia

Nel gruppo non vaccinato, i primi sintomi costituiti da arruffamento delle piume e riluttanza al movimento, sono comparsi in quinta giornata post-infezione (p.i.) e sono andati via via aggravandosi. Tutti i soggetti del gruppo di controllo sono deceduti tra il decimo e l'undicesimo giorno p.i.. All'esame necroscopico sono state riscontrate le seguenti lesioni: spesse escare cutanee nel punto d'inoculo del virus patogeno, epatomegalia, congestione polmonare. L'esame istologico di campioni di cute, fegato e polmone ha confermato la presenza di gravi lesioni in questi organi, in particolare istologicamente è stata osservata dermatite necrotica, necrosi epatica a focolai multipli e flogosi e congestione polmonare. Campioni degli stessi organi, opportunamente trattati, sono stati sottoposti all'esame virologico in uova embrionate di pollo SPF di 10 giorni d'incubazione inoculate sulla membrana corion-allantoidea. Il virus utilizzato nel

challenge è stato isolato al primo passaggio da tutti e tre gli organi prelevati. Nel gruppo vaccinato tutti i canarini sono apparsi in buone condizioni di salute, eccettuato alcuni soggetti che per 3-4 giorni hanno presentato lievi segni di malessere generale. Terminato il *challenge* (21 giorni p.i.) tutti i canarini non vaccinati sono deceduti mentre nessuno dei soggetti vaccinati è deceduto o ha mostrato sintomi riferibili ad infezione sistemica o localizzata da virus del vaiolo.

Sicurezza

Dopo la doppia somministrazione della sospensione di virus del vaccino concentrato (5 x) gli animali sono stati tenuti sotto osservazione per 21 giorni. Gli animali sono apparsi per tutta la durata della prova in buone condizioni di salute. Le lesioni nel sito d'inoculo al settimo, quattordicesimo e ventunesimo giorno dopo la vaccinazione sono state del tutto analoghe a quelle viste dopo vaccinazione standard. Nessuno dei soggetti vaccinati è deceduto o ha mostrato sintomi riferibili ad infezione sistemica o localizzata da virus del vaiolo.

Rischio di rivirulentazione nel canarino e nel pollo

I 5 passaggi effettuati non hanno evidenziato alcun segno di rivirulentazione del virus né nel canarino né nel pollo, infatti le lesioni al punto di inoculo sono andate via via riducendosi fino quasi a scomparire progressivamente nelle ultime repliche. La prova è stata ripetuta per una seconda volta partendo nuovamente dalla vaccinazione con dose standard. L'andamento della ripetizione è stato analogo alla prima volta.

Discussione

Il Poulvac® Canary Pox ha dimostrato di essere molto efficace nel proteggere gli animali dall'infezione con virus altamente patogeno e quindi evitare l'insorgenza della malattia clinicamente manifesta. Dopo il *challenge* in nessuno degli animali vaccinati si sono osservati sintomi o lesioni attribuibili a diftero-vaiolo.

Il virus presente nel vaccino, pur mantenendo intatta la capacità di immunizzare efficacemente gli animali, ha perso ogni patogenicità residua, sia quando somministrato secondo le modalità consigliate dalla ditta produttrice, sia quando somministrato più concentrato. Inoltre le prove sulla reversione alla virulenza hanno dimostrato che il virus vaccinale è dotato di elevata stabilità. La scarsa capacità di replicarsi in ospiti diversi dal canarino trova conferma nelle prove di vaccinazione effettuate nel pollo, anche in soggetti molto giovani di pochi giorni di vita, a dimostrazione della natura specie-specifica del virus del vaiolo del canarino e dei poxvirus in generale.

Considerando tali dati riteniamo giustificato concludere che il Poulvac® Canary Pox, impiegato come indicato nelle istruzioni per l'uso e nella specie alla quale è destinato, può essere ritenuto un presidio immunizzante efficace e sicuro.

Bibliografia

1. Branson W. Ritchie (1995) Poxviridae in Avian Viruses Wings Publishing Inc. Lake Worth Florida 285-311.
2. Kirnse P. (1969) Host specificity and pathogenicity of poxviruses from wild birds. Bull. Wild. Dis. Assoc. 5, 376-386.
3. Farmacopea Europea - 3ª Edizione.
4. Macwhirter P. (1994) Passeriformes. In Clinical Avian Medicine and Surgery. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1173-1199.