

INFEZIONE SPERIMENTALE CON I CEPPI DI CAMPO “ITALY-02”, “QXLIKE” E “793B” DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN POLLI DA CARNE COMMERCIALI VACCINATI CON VACCINO VIVO CONTENENTE I CEPPI H120 E D274

Massi P.¹, Tosi G.¹, Taddei R.¹, Fiorentini L.¹, Sani P.²

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione di Forlì*

²*Fort Dodge Animal Health S.P.a.*

Abstract

The ability of a live attenuated bivalent vaccine (including M41 e D274 vaccine strains) to protect against field infectious bronchitis virus (IBV) strains as Italy 02, Qxlike and 793B was investigated using commercial broilers. Protection, as measured by assensing ciliary activity of the tracheal epithelium following challenge, was excellent against field infectious IT02 and QXlike strains and good against 793B strain. Virological and serological laboratory investigations have been performed on all groups.

Riassunto

Il lavoro consiste in una prova sperimentale in broiler al fine di valutare la protezione indotta da un vaccino vivo attenuato contenente i ceppi M41 e D274 del virus della Bronchite Infettiva aviare effettuato ad un giorno di vita nei confronti dell'infezione sostenuta dai ceppi di bronchite infettiva aviare (IB) noti come Italy02, QXsimile e 793B. Il livello di protezione è stato calcolato attraverso la valutazione della ciliostasi osservata su colture d'organo (anelli tracheali). Sono stati rilevati buoni indici di protezione nei confronti dei ceppi IT02 e QX simile e soddisfacente indice di protezione nei confronti del ceppo 793B. Inoltre sono state valutate le risposte anticorpali alla vaccinazione e alle infezioni.

Introduzione

La Bronchite Infettiva aviare in Italia è la patologia respiratoria virale più diffusa nel pollo con caratteristiche di epidemia in zone avicole densamente popolate. Lo scopo del presente lavoro era quello di dimostrare l'efficacia della vaccinazione con vaccino vivo bivalente ad 1 giorno di vita nel pollo da carne attraverso la messa in evidenza della cross-protezione nei confronti di infezioni eseguite con i ceppi di campo Italy 02, QXsimile e 793B.

Materiali e metodi

Strutture e animali utilizzati nella prova

La prova di infezione sperimentale è stata condotta in Italia, nelle strutture della Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Sono stati utilizzati 100 polli da carne commerciali Ross 708 di sesso femminile. Al primo giorno di vita 25 pulcini sono stati salassati per valutare i livelli di anticorpi

di origine materna nei confronti della *Bronchite Infettiva aviare*, del *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*.

I 75 polli rimanenti sono stati suddivisi, secondo il criterio random, in cinque gruppi di 15 animali ciascuno, e immessi in unità isolanti (Montair Andersen HM® 1500), dove sono stati mantenuti durante tutto il corso della prova con alimentazione ed acqua di bevanda “*ad libitum*”.

Vaccino e protocollo sperimentale

Per la vaccinazione è stato utilizzato un vaccino vivo attenuato contro la Bronchite Infettiva Aviaria (IB) disponibile in commercio, contenente due diversi ceppi del virus IB: il ceppo H120 appartenente al sierotipo Massachusetts ed il ceppo variante Olandese D274.

Il vaccino liofilizzato è stato ricostituito, in condizioni di asepsi, in acqua distillata in modo da ottenere una dose in 0,1 ml.

I gruppi n. 1/2/3/4 sono stati vaccinati ad un giorno per via oculo-congiuntivale con il vaccino bivalente, mentre il gruppo n.5 non è stato vaccinato per IB ma solo infettato (controllo positivo) con il ceppo 793B variante inglese, come è rappresentato in tabella n.1.

Tabella 1. Riepilogo dei gruppi e dei rispettivi trattamenti.

Gruppo	Vaccinazione	Infezione Con ITO2	Infezione Con QX	Infezione Con 793B
n.1 controllo-	IB bivalente	no	no	no
n.2	IB bivalente	30gg		
n.3	IB bivalente		30gg	
n.4	IB bivalente			30gg
n.5 controllo+	NO			30gg

Sierologia

Al fine di valutare l’andamento degli anticorpi anti-IBV durante la prova, i polli di tutti i gruppi sono sottoposti a prelievi di sangue rispettivamente a 1, 30 e 45 giorni di età.

In particolare, il prelievo a 1 giorno d'età permette di rilevare il livello di anticorpi circolanti anti-IBV trasmessi dai riproduttori alla progenie (MDA), presenti al momento della prima vaccinazione. Inoltre, è stata valutata l'eventuale presenza di anticorpi di origine materna nei confronti di *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma sinoviae*.

A 30 giorni, il giorno dell'infezione sperimentale, viene valutata la risposta sierologica alla vaccinazione.

A 45 giorni d'età, al termine della prova, viene valutata la risposta anticorpale all'infezione e alle vaccinazioni/infezioni.

I titoli degli anticorpi anti-IBV sono misurati mediante l'impiego del kit ELISA commerciale PROFLOK® IBV ELISA kit (Synbiotics, USA) e del test H.I. (inibizione della emoagglutinazione) allestito con gli antigeni M41, 793B e D274.

I titoli degli anticorpi, anti-MG e anti-MS sono misurati mediante l'impiego di kit ELISA commerciali denominati, rispettivamente, PROFLOK® MG ELISA kit e PROFLOK® MS ELISA kit (Synbiotics, USA.)

Infezione sperimentale

Tutti i gruppi, eccetto il n.1 (controllo negativo), sono stati infettati all'età di 30 giorni con tre diversi ceppi di BI isolati dal campo.

- Il gruppo n.2 con il ceppo ITO2 FO4682/99
- Il gruppo n.3 con il ceppo QX simleFO 241400/07
- Il gruppo n.4 con il ceppo 793BFO16408/06
- Il gruppo n.5 (non vaccinato) con il ceppo 793BFO16408/07

Ogni pollo riceveva una dose infettante pari a 10^3 ID₅₀, disciolta in 0.1 ml di acqua distillata e somministrata mediante goccia oculo-nasale.

Parametri di valutazione

L'impatto dell'infezione sperimentale e l'effetto protettivo ottenuto mediante il programma di vaccinazione, è stato valutato eseguendo un monitoraggio individuale dei seguenti parametri: manifestazione di sintomi clinici riferibili a infezione da IBV, presenza di lesioni anatomo-patologiche all'apparato respiratorio e/o in altri organi o tessuti, grado di motilità ciliare a livello dell'epitelio tracheale rispettivamente 3 e 7 giorni dopo l'infezione (Cavanagh et al.1997), risposta sierologica nei confronti di IBV con re-isolamento e identificazione del virus IBV (Massi et al.2006; Massi et al.2009).

Rispettivamente a 3 e 7 giorni post-infezione, 5 animali per ogni gruppo venivano sottoposti ad eutanasia e ad esame autoptico per valutare eventuali lesioni macroscopiche, e allo scopo di prelevare le trachee per la valutazione della motilità ciliare e per il re-isolamento del virus dell'infezione sperimentale.

Quindici giorni dopo l'infezione i polli rimasti sono stati salassati, sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico.

Valutazione della motilità ciliare a livello dell'epitelio tracheale

Il metodo (J.Cook et al. 1999) prevede il prelievo delle trachee dagli animali da valutare. Ogni singola trachea viene posta in una provetta contenente 10 ml di terreno per tessuto-culture di organo (TOC). Con l'ausilio di un chopper, ciascuna trachea viene tagliata per ottenere degli anelli tracheali di 1 mm circa di spessore.

Vengono scelti 10 anelli (3 dalla parte superiore, 3 dalla parte inferiore e 4 dalla parte mediana dell'organo) per esaminare la motilità ciliare nei diversi tratti. Ogni singolo anello viene posto in una provetta con 1 ml di terreno per TOC. Una volta chiuse, le provette vengono sistemate in un rotatore (15 giri/ora) ed incubate a 37°C. Dopo 24 ore gli anelli tracheali vengono esaminati a 100 ingrandimenti, previa agitazione delle provette in vortex. A ciascun anello viene assegnato un punteggio da 0 a 4 secondo la scala seguente:

- 0 = motilità ciliare 100%
- 1 = motilità ciliare 75%
- 2 = motilità ciliare 50%
- 3 = motilità ciliare 25%
- 4 = motilità ciliare assente (100% di ciliostasi)

Per ogni trachea esaminata, il punteggio massimo potrà variare da 40 (nessuna protezione) a 0 (protezione completa). Quanto più basso sarà il punteggio, tanto maggiore sarà il livello di protezione; mentre un punteggio elevato indica protezione scarsa o nulla.

L'Indice di Protezione di ciascun di ciascun gruppo viene calcolato mediante la seguente formula:

$$\frac{[1 - \text{media punteggio di ciliostasi del gruppo vaccinato e infettato }] \times 100}{\text{media punteggio di ciliostasi del gruppo di controllo infettato}}$$

Più elevato sarà l'Indice di Protezione, maggiore risulterà l'efficacia del programma di vaccinazione e viceversa.

Re-isolamento ed identificazione dei virus BI

Si utilizzavano 5 uova embrionate SPF di pollo che venivano inoculate per via allantoidea a 10 giorni di età con tre passaggi a fondo cieco partendo da ogni prelievo.

L'identificazione era effettuata con la tecnica di RT-PCR (Cavanagh et al.199).

Risultati

I soggetti accasati nell'Unità Isolante n. 5 non vaccinati ed infettati con il ceppo 793B hanno presentato a partire dal terzo giorno post infezione una sindrome respiratoria con lacrimazione, scolo nasale, starnuti che si è protratta per almeno una settimana. Mentre i soggetti dei gruppi vaccinati (unità isolanti n. 2/3/4) e infettati con i tre diversi ceppi di virus bronchite non hanno manifestato sintomi respiratori.

Dopo 3 giorni e 7 giorni dal challenge venivano prelevati 5 soggetti per gruppo, su questi veniva eseguito il prelievo di sangue, quindi soppressi per eutanasia per l'esame necroscopico ed espantata la trachea per la valutazione dell'attività ciliare e per il reisolamento virale.

In seguito alla valutazione dell'attività ciliare veniva calcolata la media del punteggio di ciliostasi per ogni gruppo e l'indice di protezione ciliare come di seguito riportato.

Media del punteggio della ciliostasi fra i due prelievi

Unità isolante 1 (controlli vaccinati)	2.0
Unità isolante 2 (infettati IT02)	2.9
Unità isolante 3 (infettati QX)	7.3
Unità isolante 4 (infettati 793B)	11.9
Unità isolante 5 (c. infettati 793B)	34..3

Indice di protezione

Unità isolante 1	97
Unità isolante 2	94.5
Unità isolante 3	81.7
Unità isolante 4	68.3

Dopo 15 giorni dall'infezione venivano prelevati e soppressi tutti i polli rimanenti, sottosti a prelievo sierologico, ad esame necroscopico e prelievo di trachea e reni per il reisolamento virale.

Risultati virologici

La RT-PCR dei tre prelievi è stata eseguita su liquido allantoideo delle uova SPF inoculate al 1°, 2° e 3° passaggio con i seguenti risultati:

	I prelievo (3gg post-infezione)	II prelievo (7gg post-infezione)	III prelievo (15gg post-infezione)
U.I.n.1	Neg	Neg	Neg
U.I.n.2	Positivo	Pos.debole	Neg
U.I.n.3	Positivo	Positivo	Positivo
U.I.n.4	Positivo	Positivo	Positivo
U.I.n.5	Positivo	Positivo	Positivo

Risultati sierologici

1 giorno di vita

Elisa *Mycoplasma gallisepticum* e *synoviae*: negativi

Elisa Bronchite infettiva IDEXX tutti positivi alti

30 giorni

Titolo medio in HI

	M41	D274	793B
gruppo 1	1/32	1/32	1/16
gruppo 2	1/32	1/32	<1/16
gruppo 3	1/32	1/32	<1/16
gruppo 4	1/32	1/32	<1/16
gruppo 5	<1/16	<1/16	<1/16

A 30 giorni di vita sono risultati sieronegativi per il ceppo 793B variante inglese. Sono risultati sieropositivi bassi per il ceppo M41 classico e per il ceppo D274 variante olandese.

In Elisa sono risultati tutti negativi.

45 gg: controllo della risposta sierologica in HI alle infezioni indotte

Titolo medio in HI

	M41	D274	793B
gruppo 1	1/16	1/16	<1/16
gruppo 2	1/32	1/32	<1/16
gruppo 3	1/64	1/64	<1/16
gruppo 4	1/32	1/32	1/64
gruppo 5	1/16	1/16	1/64

Il gruppo 1 risulta sieronegativo

Il gruppo 2 presenta titoli sierologici bassi

Il gruppo 3 presenta titoli sierologici medio bassi nei confronti di D274 ed M41

Il gruppo 4 presenta titoli sierologici medio-bassi nei confronti dei ceppi saggiati

Il gruppo 5 presenta siero conversione solo nei confronti del ceppo 793B

Risultati sierologici in ELISA a fine prova

Per quanto attiene ai risultati sierologici in Elisa con il prelievo di fine prova a 45 giorni di vita, si evidenzia una netta risposta anticorpale nei gruppi vaccinati ed infettati ed una risposta debole o negativa nei gruppi solo vaccinato o solo infettato. Questo si spiega con il fatto che la vaccinazione viva effettuata ad un giorno stimola prevalentemente l'immunità mucosale e cellulo-mediata. Mentre l'infezione effettuata a 30 giorni nel gruppo 5 senza primer vaccinale non può stimolare da sola una netta risposta anticorpale.

D'altra parte nei gruppi vaccinati ad 1 giorno in cui il vaccino funziona anche da primer e stimolazione immunitaria l'infezione indotta a 30 giorni innesca facilmente una risposta anticorpale.

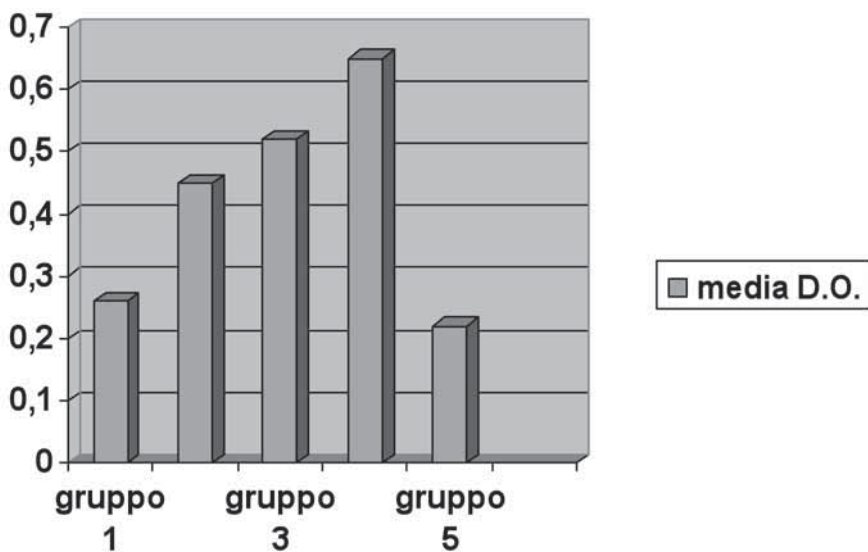
Rappresentazione grafica dei dati sierologici medi di D.O. dei valori con metodo ELISA a fine prova.

C+ 0,313

C- 0,050

Conclusioni

I ceppi di campo Italy 02, QXsimile e 793B sono circolanti e presenti in Italia nel pollame nelle varie tipologie produttive. In certe aree a produzione avicola intensiva dove la IB è endemica si assiste anche ad una cocircolazione di più ceppi di campo contemporaneamente. Si rende pertanto necessario proteggere il pollame con strategie vaccinali diversificate e ad ampio spettro immunitario.



La prova descritta ha messo in evidenza l'efficacia della vaccinazione a 1 giorno con vaccino vivo bivalente con ceppo M41 e D274 nei confronti dell'infezione effettuata a 30 giorni di vita con i tre diversi ceppi di campo a dimostrazione che un vaccino bivalente amplifica la stimolazione antigenica e prolunga la stimolazione immunitaria.

Ringraziamenti

Si ringrazia tutto il personale tecnico della Sezione di Forlì per la gentile collaborazione.

Bibliografia

1. Cavanagh D., Ellis M.M., Cook J.K. 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26, 63-74.
2. 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 Pathol.* 28, 593-605.
3. 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 viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477-485.
4. Massi P., Tosi G., Meini A. 2006. Protection of chickens vaccinated with different schemes including the 4/91 IBV vaccine strain against field IBV strain Italy 02: preliminary results. *Ital. J. Anim. Sci.* 5, 302-308.
5. Massi P., Tosi G., Fiorentini L. 2009. Experimental infectious with the "IT-02" strain of avian Infectious Bronchitis virus in commercial broilers vaccinated with different vaccination programmes using live attenuated vaccines. XVth World Veterinary Poultry Association Congress - Marrakesh, Morocco, November 8-12, 2009.