

# INTERAZIONE FRA VACCINI VIVI PER LA PROFILASSI DELLA RINOTRACHEITE DEL TACCHINO E DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE SOMMINISTRATI IN ASSOCIAZIONE AD UN GIORNO DI VITA NEL TACCHINO

Lupini C.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Muñoz O.<sup>1</sup>, Terregino C.<sup>3</sup>, Cecchettin K.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO), Italia;*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD), Italia;*

<sup>3</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italia*

## Summary

The combined administration of Newcastle Disease (ND) and avian *Metapneumovirus* (AMPV) live vaccines in turkey hatcheries is advantageous, but compatibility has not yet been demonstrated experimentally. To investigate any possible interference between the two vaccines, AMPV subtype B live vaccine was given to one-day-old turkeys either alone or in combination with two different ND vaccine strains (B1 and VG/GA). AMPV and NDV post vaccination shedding and humoral immune response were assessed. Results showed that following single or combined vaccinations both AMPV and/or ND vaccine virus was detected in the respiratory tract of all of the birds in all groups. In addition, birds were protected from virulent AMPV virus challenge and differences in clinical signs between groups vaccinated with AMPV vaccine alone or in combination with ND vaccine were not statistically significant.

## INTRODUZIONE

L'allevamento del tacchino è condotto in sistemi intensivi che, concentrando grandi numeri di animali in spazi ed aree geografiche ridotte, creano le condizioni per una rapida diffusione delle forme infettive. Per diminuire il rischio di focolai di malattia è quindi necessario ricorrere costantemente alla profilassi vaccinale, e la corretta gestione di tali piani, assieme alla applicazione di una adeguata biosicurezza, rappresenta uno dei punti cardine per la redditività dell'impresa avicola. Costanti nel nostro Paese sono gli interventi nel tacchino nei riguardi della Malattia di Newcastle (ND) (Nota del Ministero della Salute, 2005) e della Rinotracheite del Tacchino (TRT) (Catelli, 2006).

La ND, sostenuta da ceppi patogeni di *Paramyxovirus 1*, è una delle più temute malattie del pollame. Essa, quando è sostenuta da ceppi altamente patogeni, ha conseguenze devastanti, non solo per l'elevato tasso di mortalità che può essere raggiunto, ma anche per il forte impatto economico che ne consegue, derivante sia dall'adozione di una politica di eradicazione, sia dalle restrizioni al commercio imposte al Paese sede di focolaio. La TRT, sostenuta dal *Metapneumovirus* aviario (AMPV), è fra le principali patologie virali del tacchino, ed ha diffusione pressoché mondiale. La gravità di questa forma respiratoria è influenzata dall'insorgere di infezioni batteriche secondarie (Catelli, 2009).

Per entrambe le malattie, vaccini vivi vengono spesso somministrati nei primi giorni

di vita ad almeno una settimana di distanza per il timore di una possibile interferenza tra i due virus vaccinali e quindi di riduzione della protezione da essi indotta. La possibilità di associare in incubatoio tali interventi avrebbe numerosi vantaggi di ordine pratico, economico e sanitario. In quest'ottica diventa fondamentale assicurarsi che non ci siano interferenze negative fra i vaccini stessi, tali da compromettere l'efficacia delle vaccinazioni o addirittura causare effetti patologici indesiderati. L'obiettivo del presente lavoro è stato valutare, in condizioni sperimentali, l'interferenza fra due diversi ceppi vaccinali di NDV e uno di AMPV somministrati nel tacchino in associazione ad un giorno di vita, secondo un possibile schema vaccinale praticabile in incubatoio

## MATERIALE E METODI

La prova è stata eseguita in condizioni di isolamento biologico in isolatori per pollame ed ha avuto la durata complessiva di 32 giorni. Ottanta tacchinotti commerciali di un giorno di vita sono stati suddivisi in sei gruppi e vaccinati il medesimo giorno secondo il seguente schema:

- ✓ Gruppo TRT (16 animali) - ceppo AMPV sottotipo B VCO3;
- ✓ Gruppo ND1 (8 animali) - ceppo NDV B1;
- ✓ Gruppo ND2 (8 animali) - ceppo NDV VG/GA;
- ✓ Gruppo TRT/ND1 (16 animali) - ceppi AMPV sottotipo B VCO3 e NDV B1, in associazione;
- ✓ Gruppo TRT/ND2 (16 animali) - ceppi AMPV sottotipo B VCO3 e NDV VG/GA, in associazione.
- ✓ Gruppo di controllo (16 animali) - inoculati con acqua sterile.

I vaccini o l'associazione vaccinale sono stati somministrati alle dosi consigliate dalla casa produttrice.

Gli animali sono stati monitorati quotidianamente per l'eventuale comparsa di sintomatologia clinica post-vaccinale. L'eliminazione respiratoria dei virus vaccinali è stata valutata, in 8 soggetti per gruppo, da tamponi oro-faringei prelevati a tempi stabiliti (2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22, 26 e 30 giorni post-vaccinazione) al fine di valutare l'entità della colonizzazione e della replicazione dei virus vaccinali nelle sedi di elezione.

A tale scopo l'RNA è stato estratto mediante il metodo descritto da Li *et al.* (1993) e sottoposto a Real Time RT-PCR (RRT-PCR). Per NDV è stato utilizzato il metodo descritto da Cattoli *et al.* (2009). Per AMPV è stata utilizzato un protocollo di RRT-PCR che prevedeva l'utilizzo di una sonda *Molecular Beacon* sottotipo B specifica, disegnata sulla sequenza del gene che codifica per la *Small hydrophobic protein*. La *reaction mix* impiegata aveva un volume finale di 10 µl ed era composta da: 0,25 µl di SuperscriptIII RT/Platinum Taq mix, 5 µl di 2x *reaction mix*, 0,5 µl di ogni primer [SH forward ed SH reverse (20 µM)], 0,38 µl di sonda [MB SH B (20µM)], 2,43 µl di acqua per biologia molecolare e 1 µl di RNA virale. Per la preparazione della *reaction mix* si è usato il kit SuperScript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Life technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il programma di amplificazione impiegato prevedeva una prima fase di retrotrascrizione a 45°C per 30 minuti, dopodiché il campione veniva sottoposto per 2 minuti a 95°C, ed in seguito a 45 cicli di: denaturazione a 95°C per 15 secondi, *annealing* a 45°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 0,5 secondi. Al termine la piastra veniva raffreddata a 40°C per

30 secondi. L'acquisizione della fluorescenza avveniva a 45°C. Tutti i campioni con *Crossing Point* (CP) <35 erano considerati positivi.

A 7, 14, 21 e 28 giorni post-vaccinazione sono stati svolti esami sierologici per la ricerca degli anticorpi anti-AMPV, mediante tecnica ELISA (kit ELISA Flockchek® APV Ab, IDEXX Laboratories), e anti-NDV, mediante inibizione dell'emoagglutinazione (HI) (DPR 657/96). Le medie dei titoli anticorpali sono state paragonate utilizzando il test *t* di Student. Con *p*-value <0,05 la differenza è stata considerata statisticamente significativa.

A 21 giorni di vita, otto animali dei gruppi TRT, TRT/ND1, TRT/ND2 e Controllo sono stati movimentati in altri isolatori e sottoposti al challenge con AMPV sottotipo B (ceppo IT/Ty/Vr240/87) alla dose di 3,77 log<sub>10</sub> CD<sub>50</sub>/soggetto. Dal 1° giorno post-infezione (p.i.) fino al termine della prova è stata valutata quotidianamente la sintomatologia clinica, assegnando ad ogni animale un punteggio, seguendo il metodo descritto da Naylor e Jones (1994). Il confronto tra i gruppi è stato condotto utilizzando il test U di Mann Whitney. Con *p*-value <0,05 la differenza è stata considerata statisticamente significativa.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Nessun gruppo ha mostrato sintomatologia clinica dopo la vaccinazione.

L'andamento del numero di soggetti positivi/giorno alla Real Time RT-PCR per NDV, è sovrapponibile in tutti i gruppi vaccinati (figura 1). Al quarto giorno post-vaccinazione (p.v.) l'eliminazione virale interessa tutti i soggetti vaccinati. Il numero di soggetti positivi/gruppo decresce in maniera significativa dopo il decimo giorno p.v.

Il numero totale di soggetti positivi alla RRT-PCR per AMPV nei 30 giorni successivi alla vaccinazione differisce solo lievemente fra i tre gruppi vaccinati (tabella 1). Importante sottolineare che al 14° giorno p.v. tutti gli animali hanno eliminato almeno una volta AMPV.

Non risulta esserci differenza statisticamente significativa (*p*>0.05) tra i titoli anticorpali per AMPV dei gruppi vaccinati e del gruppo di controllo sino a 21 giorni post-vaccinazione (figura 2). A 28 giorni post-vaccinazione la media dei titoli anticorpali risulta invece essere differente tra i gruppi vaccinati in associazione rispetto al gruppo controllo e TRT a svantaggio di questi ultimi (*p*<0.05). Tali risultati sono analoghi a quello ottenuti nel pollo da Ganapathy *et al.* (2006), e necessitano ulteriori approfondimenti per essere spiegati.

Le medie dei titoli anticorpali HI per NDV nei gruppi vaccinati e di controllo (figura 3) decrescono sino al giorno 21 p.v. senza mostrare differenze significative tra loro (*p*>0,05). Al 28° giorno si evidenzia invece una differenza significativa fra il gruppo di controllo ed i gruppi vaccinati (*p*<0,05). Non c'è invece mai differenza significativa fra i gruppi che hanno ricevuto i vaccini ND1 o ND2 sia in singolo che in associazione. In seguito all'infezione con AMPV i soggetti del gruppo di controllo, non vaccinati, hanno mostrato la sintomatologia attesa con un punteggio medio cumulativo, nel periodo di osservazione, pari a 15,25; significativamente maggiore (*p*<0.05) rispetto ai gruppi vaccinati.

Nessuna differenza statisticamente significativa (*p*>0.05) si è osservata fra i tre gruppi vaccinati, mostrando come sia sovrapponibile il grado di protezione conferito dal vaccino AMPV somministrato in singolo o in associazione con NDV (figura 4).

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti permettono di concludere che la somministrazione al tacchino di un giorno di vita di vaccino vivo attenuato AMPV ceppo VC03, in associazione con i vaccini vivi NDV sia ceppo B1 sia ceppo VG/GA, conferisce protezione al challenge con AMPV sovrapponibile a quella evocata dal vaccino somministrato singolarmente, e non interferisce nella replicazione dei virus vaccinali a livello respiratorio.

Resta da verificare se la protezione nei riguardi di NDV a seguito di vaccinazione combinata sia sovrapponibile a quella ottenibile con la vaccinazione singola. Il valore di *shedding* dei virus ND vaccinali simile nei differenti gruppi porta a pensare che la colonizzazione e l'entità di replicazione nei tessuti d'elezione di questi virus, e di conseguenza l'immunità da essi indotta, non sia stata ridimensionata dalla somministrazione contemporanea con AMPV. Questo vale sia per il virus vaccinale a tropismo respiratorio (B1) sia per il virus a maggior tropismo enterico (VG/GA). Anche l'andamento dei titoli anticorpali ND in tutti i gruppi vaccinati sia in singolo che in associazione induce a pensare che non vi sia stata una significativa interferenza del vaccino AMPV a scapito dei vaccini NDV considerati.

La dimostrazione dell'efficacia nel tacchino di piani vaccinali che prevedano la contemporanea somministrazione di vaccini vivi attenuati per AMPV e NDV in incubatoio può avere importanti risvolti in quanto la riduzione dei singoli interventi vaccinali determina un abbattimento dei costi ad essi correlati e limitazione dello stress provocato agli animali dagli interventi stessi. Inoltre la possibilità di anticipare la vaccinazione per NDV al primo giorno di vita in incubatoio permetterebbe l'instaurarsi di un'immunità protettiva più precocemente, riducendo il periodo in cui gli animali risultano scoperti dal punto di vista immunitario nei confronti di virus potenzialmente pericolosi e permetterebbe di ridurre l'uso delle squadre di vaccinazione in campo che spesso hanno contribuito alla diffusione di virus patogeni in corso di epidemia.

## Ringraziamenti

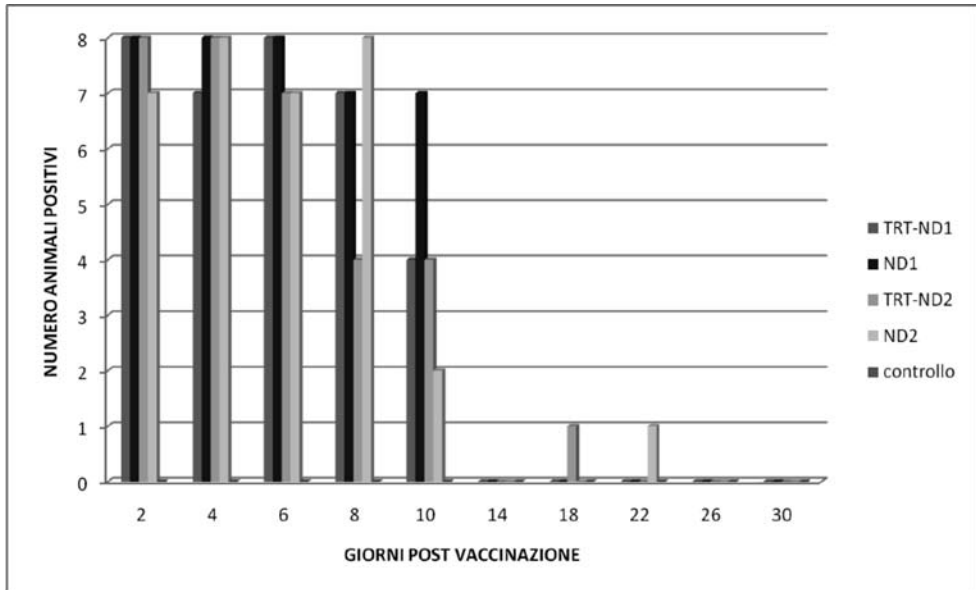
La ricerca è stata finanziata dal Ministero della Salute (RC IZSVe 26/07) e dell'Alma Mater Studiorum- Università di Bologna (RFO 2007).

## BIBLIOGRAFIA

1. Catelli E (2006). Dati epidemiologici sulle infezioni da Pneumovirus Aviare in Italia. Giornata di studio Intervet su "Malattie respiratorie e problemi di produzione", 16-23.
2. Catelli E (2009). Infezioni da Paramyxoviridae. In: Asdrubali G., Fioretti A. (Eds.) *Manuale di Patologia Aviare*. PVI, Point Veterinaire Italie, Milano, pp. 137 – 154.
3. Cattoli G, De Battisti C, Marciano S, Ormelli S, Monne I, Terregino C, Capua I (2009). False-Negative Results of a Validated Real-Time PCR Protocol for Diagnosis of Newcastle Disease Due to Genetic Variability of the Matrix Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (11): 3791-3792.
4. D.P.R. n. 657 del 15 novembre 1996. Regolamento per l'attuazione della direttiva 92/66/CEE che prevede misure comunitarie contro la malattia di Newcastle.

- Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale* n. 300 del 23 dicembre 1996.
5. Ganapathy K, Todd V, Cargill P, Montiel E, Jones RC (2006). Interaction between a live avian pneumovirus vaccine and two different Newcastle disease virus vaccines in broiler chickens with maternal antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathology*, 35: 429-434.
  6. Li J, Cook JKA, Brown TDK, Shaw K And Cavanagh D (1993). Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 22: 771-783.
  7. Naylor CJ e Jones RC (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine*, 12 (13): 1225-1230.
  8. Nota del Ministero della Salute DGVA VIII 29204/P-I.8.d/158 dell'8/08/2005.

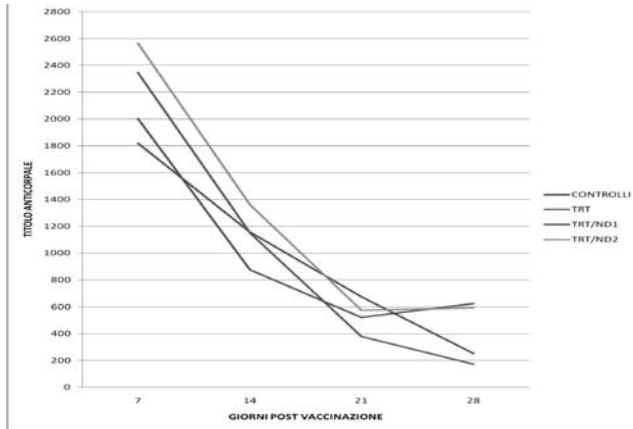
**Figura 1:** Numero di animali positivi/giorno alla Real time RT-PCR per virus vaccinale NDV.



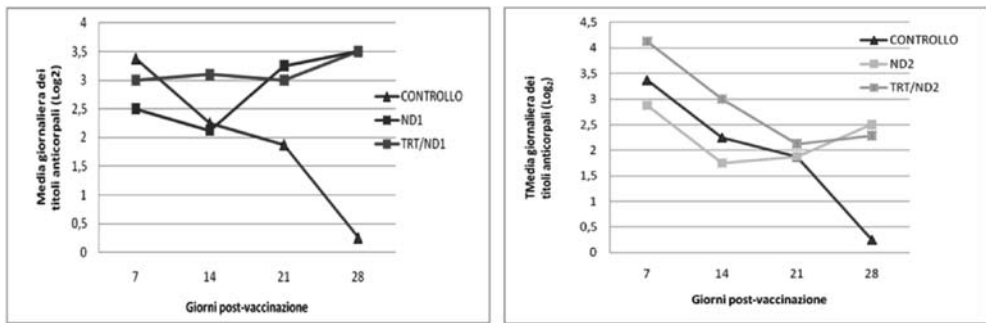
**Tabella 1:** Positività post-vaccinali alla RRT-PCR per AMPV in tamponi oro-faringei.

Giorno post-vaccinazione	Numero di soggetti positivi per AMPV			
	TRT	TRT/ND1	TRT/ND2	CONTROLLO
2	0	1	0	0
4	1	0	0	0
6	4	1	3	0
8	2	0	4	0
10	5	2	5	0
14	7	7	6	0
18	4	8	4	0
22	0	4	1	0
26	2	1	0	0
30	2	2	0	0
<b>TOTALE</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>0</b>

**Figura 2:** Andamento delle medie dei titoli anticorpali per AMPV evidenziati con test ELISA, nei gruppi vaccinati e non vaccinati.



**Figura 3:** Evoluzione della media geometrica dei titoli anticorpali HI ( $\log_2$ ) nei confronti dell'NDV nei gruppi sperimentali.



**Figura 4:** Media delle osservazioni cliniche giornaliere dei gruppi vaccinati e del gruppo di controllo a seguito di challenge con AMPV.

