

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO SINERGICO DELLA COINFEZIONE DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA H9N2 E DEL CEPPLO VELOGENO DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE IN GALLINE OVAIOLE IN PRODUZIONE

Bonfante F., Mazzetto E., Leopardi S., Maniero S., Salomoni A., Terregino C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Summary

Avian influenza (AI) and Newcastle disease virus (NDV) are two of the deadliest diseases of poultry. In the Middle East an ongoing epizootic of low pathogenicity avian influenza (LPAI) H9N2 has favored the occurrence of NDV-AI mixed infections in commercial and backyard farms of layers, broilers and turkeys. In Israel, vaccination against virulent NDV (vNDV) is mandatory but even in the presence of good flock immunity, vaccinal breaks are often reported in association with H9N2 infections.

It has been speculated that H9N2 viruses can act as immunodepressive agent or cause an epithelial damage at the level of the respiratory tract that in turn facilitates secondary bacterial or viral infections. In this study, we evaluated how the exposure of specific pathogen free (SPF) chickens to a H9N2 challenge interacts with a subsequent vNDV infection. Moreover, to understand whether NDV outbreaks in vaccinated flocks in the field might be actually associated with a prior H9N2 or concomitant infection, we reproduced in a controlled setting the NDV vaccination protocol for laying hens adopted in Israel, and hence compared clinical, virological and productive data after the challenge of birds with either NDV alone or the combination of H9N2/NDV.

INTRODUZIONE

L'influenza aviaria e la malattia di Newcastle sono due delle più devastanti malattie infettive dell'avicoltura e si presentano come problematiche caratterizzate da un forte impatto in termini economici e di salute pubblica veterinaria.

A partire dagli anni 2000 virus influenzali a bassa patogenicità del sottotipo H9N2 hanno causato frequenti epidemie in diverse regioni asiatiche, in Medio Oriente, nel Nord Africa, e sporadicamente anche in Europa.

In particolare in Israele, la circolazione del virus H9N2 è stata associata con cali dell'ovodeposizione ed episodi di mortalità da NDV in allevamenti di galline ovaiole e riproduttori legati a rotture vaccinali (Banet-Noach et al., 2007) hundreds of H9N2 viruses have been isolated from all types of domestic birds. Although H9N2 is a low-pathogenicity virus, disease has been observed in all types of poultry in the field. Clinical signs ranged from very mild disease to high morbidity and mortality when the virus was associated with a secondary pathogen. Because of the wide range of the virus and the great losses it caused, initially a local vaccination program was implemented, but mass vaccination was quickly authorized. A local strain, isolated in 2002 was selected and is currently in use as an inactivated vaccine. An intensive operation is in progress to characterize the isolates. Several genes (hemagglutinin [HA], neuraminidase, nonstructural protein, nucleoprotein, and matrix. Questi epi-

sodi risultano difficilmente spiegabili alla luce di un diffuso programma di vaccinazione contro NDV molto efficace ed in grado di conferire titoli anticorpali elevati fin dal primo mese di età, coprendo le diverse fasi produttive degli animali. Nell'ambito del progetto europeo NADIV finanziato dall'iniziativa Aniwha-Eranet, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) ha intrapreso una collaborazione con il Kimron Veterinary Institute, Israele, per approcciare la problematica della circolazione dei due virus al fine di comprendere la reale portata del fenomeno da un punto di vista clinico, virologico e per migliorare il controllo della malattia.

La ricerca si pone in particolare due obiettivi: a) comprendere come i due agenti infettivi interagiscano dal punto di vista clinico e virologico al variare della dose di NDV; b) verificare se il protocollo vaccinale applicato in campo contro la malattia di Newcastle sia in grado di proteggere ovaiole in deposizione, in presenza di H9N2.

Particolare attenzione è stata rivolta a valutare l'entità della replicazione dei virus a livello dell'apparato riproduttore, in associazione ad una accurata valutazione di parametri produttivi quali la quantità delle uova deposte e lo spessore del guscio.

MATERIALI E METODI

Virus e animali

I virus utilizzati per le infezioni sperimentali sono il virus velogeno di NDV (vNDV), genotipo VII e ceppo chicken/Israele/Maaleh-Hachamsha/998/2011 e il virus LPAI H9N2 A/chicken/Israele/1163/2011. Per questo studio sono state testate 170 galline ovaiole SPF di razza *White Leghorn*, accasate in isolatori a pressione negativa con filtri High Efficiency Particulate Air Filter (HEPA) all'interno delle strutture IZSve. Cinquanta di queste sono state allevate con un regime alimentare specifico per pollastre e un programma di ore di luce controllato in modo da favorire l'inizio ed il mantenimento dell'ovodeposizione. Nei gruppi destinati all'ovodeposizione, a diciotto settimane di età, sono stati inseriti i nidi per la cova. La sperimentazione è stata condotta in ottemperanza con quanto previsto dal D. L.vo 26/2014 e dalle linee guida nazionali ed internazionali sul benessere animale, previo parere favorevole del comitato etico dell'IZSve.

Disegno sperimentale

Nel primo esperimento, sei gruppi di dieci galline ovaiole di sei settimane, sono stati infettati con dosi scalari di vNDV, tramite somministrazione oro-nasale di 100 µl di liquido allantoideo contenente da 10^1 a 10^6 EID₅₀. Lo stesso protocollo è stato applicato ad un secondo gruppo di ovaiole infettate tre giorni prima con il virus H9N2. I due gruppi sono stati identificati rispettivamente a seconda del tipo di infezione e della dose di NDV somministrata (i.e. NDV 10^1 - 10^6 o H9-NDV 10^1 - 10^6). La valutazione clinica dei gruppi è avvenuta quotidianamente mentre la raccolta dei tamponi tracheali e cloacali è stata programmata a 2, 4, 6 e 8 giorni post-infezione (p.i.) NDV. Il sangue per la valutazione della sieroconversione è stato prelevato a ventuno giorni dall'infezione.

Nel secondo esperimento cinque gruppi da dieci galline ovaiole ciascuno, sono stati vaccinati sia con un vaccino per ND inattivato registrato in Israele somministrato (0,5 ml) con puntura sottocutanea nella parte distale del collo, sia con un vaccino vivo, contenente il ceppo VH di NDV (di produzione israeliana), nebulizzato con pistola spray all'interno degli isolatori, in modo da somministrare gocce del diame-

tro di 50-150 μm . Lo schema vaccinale adottato ha previsto dieci somministrazioni a partire da un giorno di vita sino alla trentesima settimana, al fine di riprodurre il protocollo vaccinale utilizzato in campo in Israele.

Prelievi di sangue per valutare la sieroconversione sono stati programmati a 4, 6, 18 e 32 settimane. Alla trentaduesima settimana due gruppi classificati come NDV-a e NDV-b sono stati infettati con il ceppo vNDV di challenge per via oculo-nasale con 100 μl di liquido allantoideo contenente 10^6 EID₅₀, e altri due gruppi definiti H9-a e H9-b oltre ad essere infettati allo stesso modo con il virus di challenge vNDV, sono stati infettati tre giorni prima con una dose di 10^6 EID₅₀ di H9N2 per via oro-nasale. Il quinto gruppo è stato regolarmente vaccinato ma non infettato in quanto controllo per la produzione di uova.

Tutti i gruppi sono stati monitorati regolarmente per la registrazione dei dati clinici. Le ovaiole dei gruppi H9-a e NDV-a sono state campionate per la raccolta di tamponi tracheali e cloacali e dei principali tratti dell'ovidotto (infundibolo, magno, istmo e utero) a 2, 4 e 7 giorni p.i. NDV. I gruppi H9-b e NDV-b sono stati destinati esclusivamente alla raccolta giornaliera delle uova, in modo da limitare eventuali variazioni qualitative e quantitative nell'ovodeposizione legate a stress da manipolazione. Le uova sono state raccolte a partire dalla settimana precedente l'infezione fino alla fine dello studio, con l'obiettivo di valutare l'impatto delle infezioni sperimentali in termini di produttività e alterazione dello spessore del guscio. Inoltre, una volta infettati gli animali, ogni uovo è stato campionato per la raccolta dell'albume come matrice per la ricerca di NDV ed H9N2. Lo spessore del guscio è stato misurato al suo polo ottuso, previo distacco della membrana testacea interna, utilizzando uno specifico calibro di precisione. Gli animali dei gruppi NDV-b e H9-b sono stati sottoposti a prelievo di sangue per monitorare la sieroconversione a 21 giorni dall'infezione.

Sierologia

Il test di inibizione dell'emoagglutinazione è stato eseguito utilizzando l'antigene omologo di ognuno dei due virus di challenge e l'antigene vaccinale VH, secondo le procedure ufficiali del manuale OIE (OIE, 2014).

Virologia

I tamponi, i tratti di ovidotto e gli albumi delle uova sono stati processati per effettuare l'estrazione dell'RNA. Il rilevamento del gene M dell'Influenza A è stato eseguito tramite metodica di real time RT-PCR (rRT-PCR) utilizzando sonda e primers riportati da Spackman *et al.*, (Spackman *et al.*, 2002) H5 and H7 hemagglutinin subtype-specific probe sets were developed based on North American avian influenza virus sequences. The RRT-PCR assay utilizes a one-step RT-PCR protocol and fluorogenic hydrolysis type probes. The matrix gene RRT-PCR assay has a detection limit of 10 fg or approximately 1,000 copies of target RNA and can detect 0.1 50% egg infective dose of virus. The H5-and H7-specific probe sets each have a detection limit of 100 fg of target RNA or approximately 10^3 to 10^4 gene copies. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay were directly compared with those of the current standard for detection of influenza virus: virus isolation (VI mentre per il rilevamento del gene F dell'NDV è stata utilizzata la sonda FAM (LpromGB) e la coppia di primers NDF e NDR, gentilmente forniti da Animal and Plant Health Agency, UK.

Immunologia

Da ogni tratto dell'ovidotto sono stati prelevati tre frammenti di tessuto per la coltura *ex vivo* di espianti. Dopo 48 ore di incubazione a 37°C il surnatante di ogni espianto è stato raccolto, chiarificato, e conservato a -20°C. I campioni sono stati successivamente inviati al CODA-CERVA (Veterinary and Agrochemical Research Centre, Belgio) per la quantificazione tramite metodica ELISA delle immunoglobuline contro NDV del tipo G, M ed A.

RISULTATI

Primo esperimento

La pre-esposizione degli animali al virus H9N2 ha portato ad un aumento della mortalità a partire dalla dose di 10^3 EID₅₀. Inoltre in presenza di H9N2 la minima dose infettante di NDV, valutata in termini di eliminazione virale e sierconversione, è calata da 10^2 a 10^1 EID₅₀ (**Fig. 1**). Per quanto riguarda l'inizio dell'eliminazione virale a livello tracheale, nei gruppi H9-NDV il virus è stato rilevato in media 2,8-0,4 giorni più tardi rispetto ai gruppi NDV, registrando un ritardo inversamente proporzionale alla dose di NDV. Questa differenza in termini di tempo è risultata statisticamente significativa alle dosi 10^1 - 10^3 EID₅₀. Analogamente il tempo medio di insorgenza della mortalità nei gruppi H9-NDV è stato in media pari o superiore a quello registrato nei gruppi NDV, esclusa la dose 10^6 EID₅₀.

Secondo esperimento

A partire dalla quarta settimana di età i titoli medi di HI contro i virus di challenge e vaccinale hanno raggiunto un valore pari a 8 log₂. Tra quattro e trentadue settimane, l'innalzamento del titolo anticorpale è avvenuto gradualmente raggiungendo un valore di plateau tra 8,1-9,0 log₂, rispettivamente per il virus di challenge ed il ceppo VH.

Indipendentemente dall'esposizione al virus H9N2, tutti gli animali sono sopravvissuti al challenge da NDV. I gruppi coinfezati H9/NDV hanno manifestato moderati segni clinici quali penne arruffate, abbattimento, inattività, edema perioculare, e infiammazione della congiuntiva, con un aggravamento dello stato di abbattimento tra 5-9 giorni post-challenge H9N2. Nei gruppi infetti NDV è stato registrato un lieve calo dell'attività tra 3-7 giorni post-infezione NDV.

Tutti i tamponi e tutti gli organi di entrambi i gruppi NDV e H9/NDV sono risultati negativi alla rRT-PCR per NDV, mentre tutti i tamponi tracheali e gran parte dei tamponi cloacali sono risultati positivi per influenza nel gruppo H9/NDV (**Tab. 1**). La replicazione del virus H9N2 a livello dei quattro tratti dell'ovidotto è stata rilevata tramite rRT-PCR ai giorni 5 e 7 post-infezione rispettivamente in 2/4 e 2/3 dei soggetti campionati.

Le analisi sierologiche non hanno identificato alcuna sierconversione a 21 giorni p.i. verso il virus di challenge NDV, confermando quanto rilevato sul piano virologico.

I surnatanti dei diversi espianti hanno riportato valori di assorbanza per IgA ed IgM sempre inferiori ai valori registrati per le IgG in ogni tratto analizzato ed in ogni tempo di prelievo. Ad una analisi statistica preliminare, i surnatanti ottenuti da animali del gruppo H9/NDV hanno riportato un rialzo significativo delle IgG contro NDV al giorno 7 post-challenge H9N2, seguito da un calo netto al giorno 10 post-infezione,

mentre nel gruppo NDV un rialzo significativo si è registrato solo al 10° giorno. Il numero di uova deposte nel gruppo H9/NDV è calato costantemente per 6 giorni a partire dal giorno 3 post-infezione H9N2, registrando valori significativamente inferiori alla media di deposizione registrata nella settimana precedente il challenge. La produzione totale di uova nei 25 giorni precedenti l'infezione rispetto ai 25 giorni seguenti l'infezione è calata del 12,1% per il gruppo NDV e del 18,6% nel gruppo H9/NDV. I valori medi degli spessori dei gusci delle uova misurati nella settimana precedente all'infezione sono stati confrontati con i valori medi rilevati nelle tre settimane a seguire. Le uova raccolte nel gruppo H9-b hanno registrato una diminuzione dello spessore pari al 4,3%, 2,4% e 5,8% rispettivamente nella prima, seconda e terza settimana post infezione, mentre nel gruppo NDV-b la diminuzione è stata del 1,9%, 0,2% e 4,14%.

DISCUSSIONE

Il primo studio ha evidenziato come l'esposizione di galline SPF ad un virus LPAI del sottotipo H9N2 possa esercitare su una superinfezione da NDV un duplice effetto, di sinergia ed al contempo di interferenza virale. In presenza di H9N2 è stato infatti osservato un abbassamento della dose minima infettante di vNDV, da 10^2 a 10^1 EID₅₀. La sinergia si è inoltre manifestata come incremento della mortalità, un fenomeno ascrivibile ad una esacerbazione della patologia, ed ampiamente riportato in letteratura per studi di co-infezione virali-batteriche ma in apparente contrasto con quanto descritto da Costa-Hurtado, secondo la quale una pre-esposizione a virus NDV mesogeno o velogeno riduce la mortalità di una successiva infezione da virus aviario ad alta patogenicità (Costa-Hurtado et al., 2015, 2014).

L'interferenza virale è stata invece osservata come un posticipo della replicazione del virus NDV e della sintomatologia e mortalità ad essa associate. Tali evidenze sperimentali confermano in parte quanto dimostrato dagli studi di Ge *et al.*, (Ge et al., 2012) secondo i quali i virus influenzali a bassa patogenicità hanno un vantaggio competitivo rispetto a virus NDV cresciuti simultaneamente in embrioni di pollo SPF. Tale vantaggio è riportato aumentare nel caso in cui il virus influenzale venga inoculato prima del virus NDV.

Dal punto di vista teorico, esistono diverse spiegazioni per giustificare il fenomeno di interferenza virale osservato nei nostri studi. La replicazione virale influenzale, induce infatti la produzione di interferone gamma, una molecola in grado di stimolare la sintesi di particolari proteine capaci di arrestare a diversi stadi il ciclo di replicazione virale. Inoltre, NDV ed AI, condividono alcuni recettori cellulari, acidi sialici, per i quali si instaurerebbe una competizione per il legame e quindi una minore possibilità di iniziare il ciclo replicativo per l'agente infettante secondario.

Un'ulteriore speculazione possibile resta quella di imputare lo svantaggio replicativo del virus NDV ad una ridotta disponibilità di strutture cellulari per la produzione di RNA e proteine, data la pre-esistente replicazione del virus H9N2 a livello degli stessi tessuti target.

Il secondo studio ha dimostrato che in presenza di un buon titolo anticorpale, l'infezione del virus H9N2, pur inducendo uno stato patologico clinicamente evidente, non ha la capacità di compromettere la protezione vaccinale contro un virus vNDV.

Questi dati, seppure ottenuti in condizioni di laboratorio, confermano che lo schema vaccinale adottato in campo in Israele per prevenire la malattia di Newcastle è efficace,

sia in termini di immunogenicità dei vaccini, sia in termini di identità antigenica tra ceppo vaccinale e virus vNDV circolanti. Resta da capire se in condizioni di campo, la presenza di agenti stressanti ed immunosoppressori, congiuntamente all'infezione da H9N2 possa favorire delle condizioni in grado di indebolire lo stato immunitario degli animali al punto da rompere la protezione contro vNDV.

La replicazione del virus H9N2 a livello dell'ovidotto fino a 5 e 7 giorni p.i. ha compromesso la funzionalità dell'organo traducendosi in un calo dell'ovodeposizione ed un assottigliamento dei gusci durante un periodo di tre settimane, confermando in parte quanto osservato da Qi et al, (Qi et al., 2016). Ulteriori studi permetteranno di valutare la durata del danno funzionale in modo da chiarire se la circolazione di questo virus in un allevamento di galline ovaiole possa tradursi in un calo produttivo permanente.

Gli studi di immunologia condotti sui surnatanti di espunti di ovidotto hanno rilevato pattern di produzione anticorpale contro il virus NDV molto differenti tra i due gruppi, nonostante la replicazione del virus e la sierologia non abbiano dato riscontro di infezione in nessuno dei gruppi. Il calo brusco delle IgG anti-NDV nei soggetti infetti con H9N2, a 10 giorni p.i. potrebbe dipendere da uno stato di fibrosi del tessuto in coltura o da un effetto immunosoppressivo del virus sul tessuto linfatico locale. Approfondimenti di tipo istologico potranno verificare le suddette ipotesi.

I virus H9N2 non sono oggetto di campagne vaccinali in larga parte delle regioni in cui sono endemici e, non essendo virus del sottotipo H5/H7, non comportano misure di controllo specifiche per l'eradicazione della malattia. I dati riportati in questo lavoro confermano la necessità di contenere la circolazione dei virus H9N2, al fine di prevenire cali significativi dell'ovodeposizione.

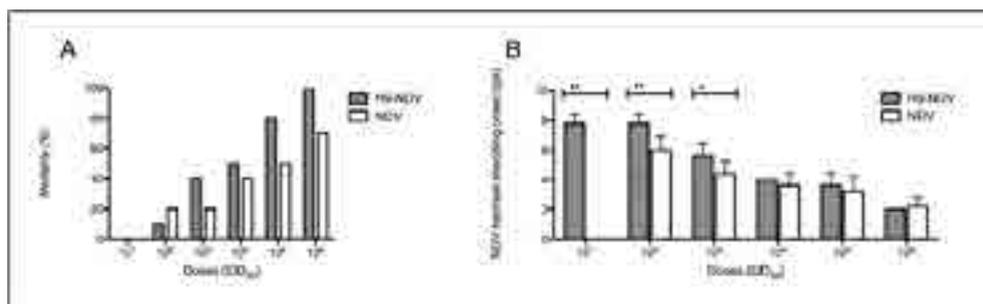


Fig.1 A) Mortalità degli animali infettati H9-NDV e NDV; B) Media e \pm deviazione standard dell'inizio dell'eliminazione virale tracheale degli animali infettati H9-NDV e NDV in giorni post-infezione (dpi= day post infection). **= $P < 0.001$; *= $P < 0.01$;

Gruppo	H9-NDV			
	Giorni	3p.i.	5p.i.	7p.i.
TT		9/9	9/9	5/5
TC		5/9	7/9	3/5

Tab.1 Positività al gene M nella rRT-PCR dei tamponi tracheali e cloacali (TT e TC) dei gruppi di animali coinfectati H9-NDV a 3, 5 e 7 giorni post-infezione H9N2.

BIBLIOGRAFIA

- Banet-Noach, C., Perk, S., Simanov, L., Grebenyuk, N., Rozenblut, E., Pokamunski, S., Pirak, M., Tendler, Y., Panshin, a, 2007. H9N2 influenza viruses from Israeli poultry: a five-year outbreak. *Avian Dis.* 51, 290–6.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Miller, P.J., Shepherd, E., DeJesus, E., Smith, D.M., Pantin-Jackwood, M.J., 2015. Effect of infection with a mesogenic strain of Newcastle Disease Virus on infection with Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in chickens.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Miller, P.J., Spackman, E., Kapczynski, D.R., Swayne, D.E., Shepherd, E., Smith, D., Zsak, A., Pantin-Jackwood, M., 2014. Virus interference between H7N2 low pathogenic avian influenza virus and lentogenic Newcastle disease virus in experimental co-infections in chickens and turkeys. *Vet. Res.* 45, 1. doi:10.1186/1297-9716-45-1
- Edition, S., 2008. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES (mammals , birds and bees) Sixth Edition.
- Ge, S., Zheng, D., Zhao, Y., Liu, H., Liu, W., Sun, Q., Li, J., Yu, S., Zuo, Y., Han, X., Li, L., Lv, Y., Wang, Y., Liu, X., Wang, Z., 2012. Evaluating viral interference between Influenza virus and Newcastle disease virus using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in chicken eggs. *Virology* 453, 128. doi:10.1016/j.virol.2012.05.012
- Qi, X., Tan, D., Wu, C., Tang, C., Li, T., Han, X., Wang, J., Liu, C., Li, R., Wang, J., 2016. Deterioration of eggshell quality in laying hens experimentally infected with H9N2 avian influenza virus. *Vet. Res.* 47, 35. doi:10.1186/s13567-016-0322-4
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L., 2002. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutini. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256–3260. doi:10.1128/JCM.40.9.3256