

# **EVIDENZE DI CAMPO DELL'EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE PER BRONCHITE INFETTIVA CON CEPPI MASS E QX NEI CONFRONTI DELL'INFEZIONE DA CEPPI DI CAMPO DI GENOTIPO Q1.**

Russo E.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Tucciarone C.M.<sup>2</sup>, Longoni C.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *MSD Animal Health s.r.l., Via F.lli Cervi snc, Centro Direzionale Milano Due - Palazzo Canova, 20090, Segrate (MI)*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)*

## **Summary**

Infectious bronchitis virus (IBV) is an highly contagious Avian Coronavirus, and causes respiratory symptoms and serious economic losses for the worldwide chicken industry. In Northern Italy the prevalent strain is QX, and many farms vaccinated with the association of Mass and QX strains.

A monitoring program was carried out in some farms vaccinated with a Mass strain at the hatchery and Nobilis IB Primo QX spray in field at day 1. A farm with previous QX strains isolation was selected, and two consequent cycles were monitored. Tracheal and cloacal swabs were collected at 5, 8, 12, 15, 19, 23, 29, 37, 43, 50 and 57 days from 10 birds, and blood samples were collected since 15 days, every week, from 20 birds.

The swabs were processed in pool and 2 real time PCR specific for the two vaccines were conducted. An test HI was performed on blood samples for the titration of antibodies against IBV QX, Mass and 793B strains, in the second cycle Q1 was added. During the first cycle the birds showed mild respiratory symptoms at day 16 for 24h, no mortality was present and no treatment was required, and around day 43 for a couple of days, with presence of swollen head syndrome and mortality. A PCR for IBV and aMPV was conducted on swabs collected at days 15, 43 and 50, and sequencing for IBV positive samples was carried out. IBV Q1 strain was detected at days 15 and 50 and aMPV was detected at day 50. During the second cycle no symptoms were detected, but the presence of two peak in serology suggested the presence of field infection and IBV field QX strain was identified at day 29 and 36.

In this case the vaccination with a Mass strain associated with a QX was effective not only for the control of a IBV QX strain infection, but also against IBV Q1 strain infection. Further studies in laboratory with known challenge will be necessary to confirm this result.

## **INTRODUZIONE**

Il virus della Bronchite Infettiva (IBV) appartiene alla famiglia Coronaviridae, genere Coronavirus. Questo virus causa una infezione del tratto respiratorio che viene spesso complicata da patogeni secondari quali causando ingenti perdite economiche. Una delle caratteristiche principali di questo virus è la spiccata variabilità antigenica dovuta ad un tasso elevato di mutazioni genetiche. Nel corso degli anni sono stati isolati numerosi ceppi di IBV appartenenti a genotipi differenti con diffusione e prevalenza variabile a seconda dell'area geografica.<sup>1</sup>

Il sistema di controllo maggiormente utilizzato per questa patologia è la vaccinazione. Tra genotipi antigenicamente diversi non c'è cross-protezione, tuttavia l'associazione di vaccini appartenenti a genotipi differenti permette un ampliamento dello spettro di protezione secondo un concetto chiamato "protectotipo".<sup>2</sup>

Il genotipo di IBV attualmente prevalente in Italia è il QX, seguito da 793B, Mass e Q1.<sup>3</sup> I piani vaccinali maggiormente utilizzati nei broiler prevedono l'associazione di Mass e 793/B, di dimostrata efficacia nella protezione sia per QX che per Q1, e l'associazione di Mass e QX, per cui non sono presenti dati relativi alla cross-protezione.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Nel presente studio è stato sottoposto a campionamento un allevamento di broiler per due cicli produttivi successivi (luglio-settembre 2015 e settembre-novembre 2015).

Gli animali sono stati tutti sottoposti a due vaccinazioni spray per IBV: la prima in incubatoio con ceppo appartenente al genotipo Mass, la seconda all'arrivo in allevamento, ad 1 giorno di vita con vaccino Nobilis IB Primo QX (ceppo D388, genotipo QX).

Gli animali dell'allevamento oggetto di studio sono stati campionati mediante tamponi tracheali e cloacali per indagini molecolari ai giorni: 8, 12, 15, 19, 23, 29, 37, 43, 50 e 57 nel primo ciclo, e nei giorni 5, 8, 12, 15, 19, 22, 29, 36, 43, 51 e 57 nel secondo ciclo. Per il monitoraggio sierologico in entrambi i cicli sono stati effettuati prelievi settimanali a partire dalle 2 settimane di età.

Gli animali sono inoltre stati monitorati clinicamente durante tutto il ciclo per rilevare la presenza di sintomatologia respiratoria.

### *Analisi molecolari*

Il campionamento ha previsto la raccolta di 10 tamponi tracheali e 10 tamponi cloacali da far asciugare per 10 minuti all'aria allo scopo di limitare la crescita di batteri e/o muffe e mantenuti a temperatura ambiente sino all'invio in laboratorio di virologia del Dipartimento MAPS (tempo sempre inferiore alle 48h).

I tamponi sono stati analizzati in *pool* costituiti sulla base del momento e del sito di prelievo. L'RNA estratto mediante Kit del commercio è stato sottoposto a due Real-time RT-PCR disegnate e validate (in termini di sensibilità e specificità) per questo studio. Una di queste è specifica per i ceppi IBV genotipo QX presenti nei due vaccini attualmente commercializzati in Italia. Non è invece in grado di amplificare ceppi QX di campo italiani.

A partire da virus IBV del genotipo ricercato è stata prodotta per ciascuna Real-time RT-PCR una curva standard di calibrazione in modo da poter poi quantificare i campioni oggetto dell'indagine. Per il genotipo QX è stato utilizzato il vaccino Nobilis IB Primo QX che ha mostrato un titolo su organocolture di anelli tracheali di pollo di 105.83CID50/ml mentre per il genotipo Mass è stato utilizzato un ceppo di campo in nostro possesso con un titolo di 105.5CID50/ml.

Inoltre quando riscontrata sintomatologia respiratoria, o in corrispondenza dei 15

giorni precedenti a marcati rialzi anticorpali per IBV, è stata effettuata una PCR generica per IBV<sup>4</sup> seguita da sequenziamento per l'individuazione di ceppi di IBV di campo e, in caso di sintomatologia respiratoria una real-time RT-PCR per aMPV in grado di evidenziare e differenziare aMPV sottotipo A e B<sup>5</sup>.

### Analisi sierologiche

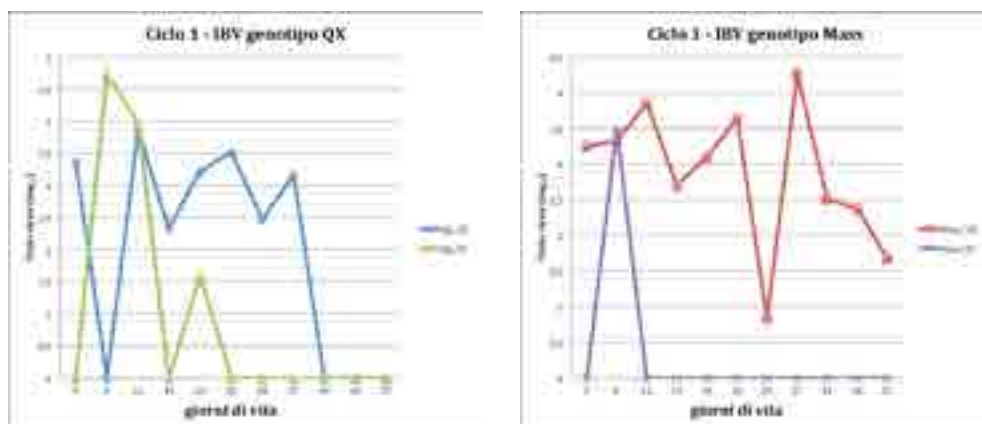
Per ogni allevamento e tempo di campionamento sono stati effettuati 20 prelievi di sangue, fatti sierare e consegnati per le analisi all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie. Su ogni siero è stata fatta una quantificazione degli anticorpi per Bronchite Infettiva varianti Mass, 793/B, QX e Q1 in mediante inibizione della sieroagglutinazione (HI).

## RISULTATI

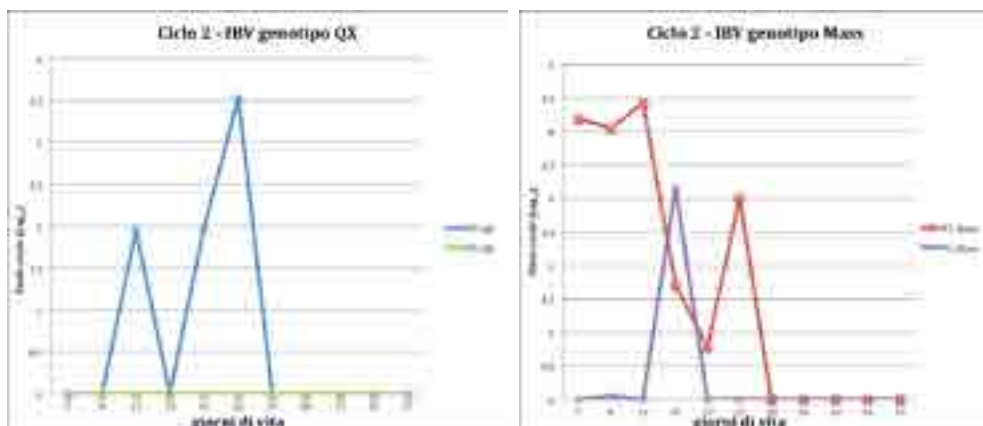
Nelle Figure 1 e 2 vengono riportati i risultati delle due real-time RT-PCR per IBV. Si può osservare come tutti i campioni dell'apparato respiratorio (tamponi tracheali) del primo ciclo produttivo monitorato sono risultati positivi alla Real-time RT-PCR specifica per Mass mentre tutti i pool dei tamponi cloacali, ad eccezione di quello prelevato a 8 giorni, sono risultati negativi a IBV Mass. Nel secondo ciclo produttivo tutti i campioni tracheali prelevati sino al 29° giorno e quelli cloacali prelevati dal 5° al 15° sono risultati positivi per IBV Mass. I campioni cloacali prelevati al 5°, 8° e 12° giorno hanno mostrato titoli virali molto bassi come si può osservare nella Figura 2.

Sono state riscontrate minori positività per IBV QX. I campioni dell'apparato respiratorio prelevati nel primo ciclo monitorato al 5° giorno e quelli dal 12° al 37° e nel secondo ciclo all'8°, 15° e 19°, sono risultati positivi. IBV genotipo QX è stato riscontrato in pool di tamponi cloacali prelevati all'8°, 12° e 19° giorno nel primo ciclo produttivo monitorato e al 19° giorno nel secondo ciclo produttivo.

**Figura 1.** Risultati delle Real-time RT-PCRs specifiche per IBV genotipo QX (a sinistra) e genotipo Mass (a destra) effettuate sui tamponi tracheali (TT) e cloacali (TC) del primo ciclo produttivo monitorato.



**Figura 2.** Risultati delle Real-time RT-PCRs specifiche per IBV genotipo QX (a sinistra) e genotipo Mass (a destra) effettuate sui tamponi tracheali (TT) e cloacali (TC) del secondo ciclo produttivo monitorato.



L'esame clinico del primo ciclo ha evidenziato una forma respiratoria molto lieve a 15 giorni regredita senza bisogno di utilizzare antibiotici, e a 50 giorni una forma respiratoria accompagnata da sindrome della testa gonfia e rialzo di mortalità. Nel corso del secondo ciclo non sono stati riscontrati sintomi respiratori.

I pool dei tamponi tracheali dei giorni 15 e 50 del primo ciclo e quelli dei giorni 5, 8, 12, 29 e 36 del secondo ciclo sono stati sottoposti a PCR generica per IBV e sequenziamento. Nel primo ciclo produttivo è stato possibile amplificare e sequenziare IBV genotipo Q1 da campioni prelevati al 15° e 50° giorno di età degli animali. Nel secondo ciclo monitorato, IBV genotipo QX è stato rilevato da tamponi tracheali prelevati a 29 e 36 giorni, mentre i tamponi prelevati a 5, 8 e 12 giorni sono risultati positivi per IBV genotipo Mass.

A 43 giorni nel primo ciclo è stato evidenziato, mediante real-time RT-PCR, aMPV sottotipo B ad alti titoli virali.

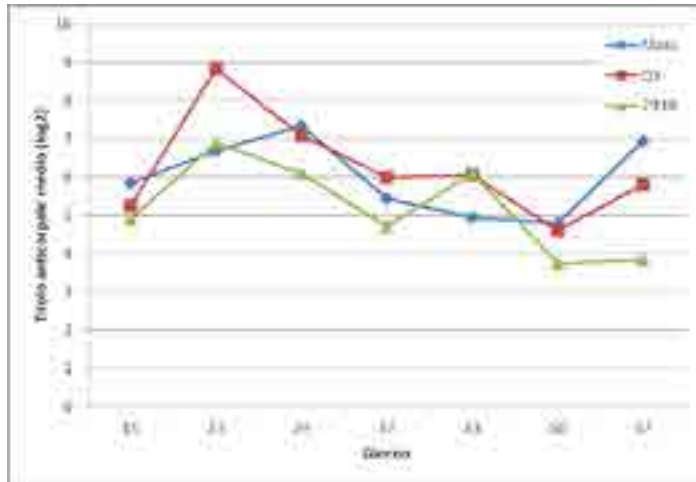
In Figura 3 e 4 vengono riportati i risultati delle analisi sierologiche effettuate durante il primo e il secondo ciclo.

Nel primo ciclo si può notare che già a 15 giorni gli animali avevano sierconvertito con un titolo anticorpale compatibile con la vaccinazione con vaccini del ceppo Mass e QX, i titoli per 793/B sono da considerarsi un trascinarsi. Il livello medio dei titoli anticorpali per le varianti per cui è vaccinato (Mass e QX) si è sempre mantenuto al di sopra del limite di positività (1:16, 4 nel grafico log<sub>2</sub>). Il picco a 23 giorni è conseguente all'infezione da IBV di campo ceppo Q1.

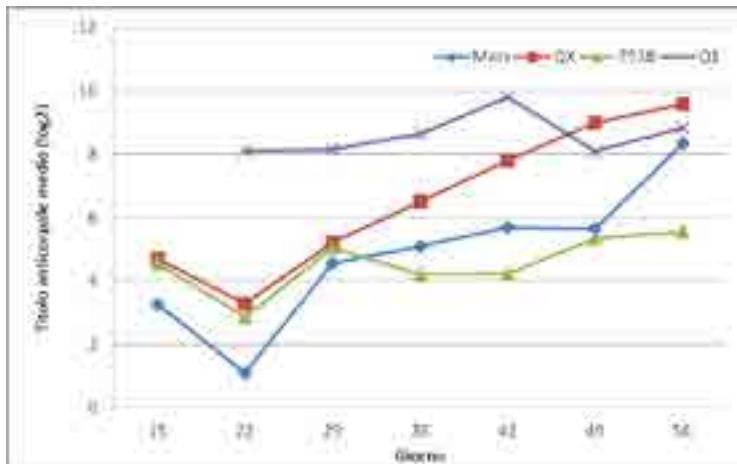
Nel secondo ciclo è presente una sierconversione molto elevata per Q1 già dal 22° giorno, che sembrerebbe indicare una infezione da IBV genotipo Q1 che però non è stato evidenziato dalle analisi molecolari.

L'infezione da IBV ceppo QX causa il marcato rialzo anticorpale per QX da giorno 36 in poi.

**Figura 3.** Risultati della HI effettuata sui sieri per IB genotipo Mass, 793/B e QX nel corso del primo ciclo.



**Figura 4.** Risultati della HI effettuata sui sieri per IB genotipo Mass, 793/B, QX e Q1 nel corso del secondo ciclo.



### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo monitoraggio ha permesso di evidenziare la replicazione e la persistenza di entrambi i vaccini impiegati (Mass e QX) a livello tracheale anche quando somministrati entrambi ad 1 giorno di vita. A livello cloacale invece la replicazione si è dimostrata scarsa per entrambi i vaccini.

I risultati sierologici hanno evidenziato come la vaccinazione con due ceppi differenti (in questo caso Mass e QX) determini non solo lo sviluppo di buoni titoli anticorpali

nei confronti dei genotipi utilizzati per la vaccinazione, ma anche un innalzamento per trascinarsi del titolo relativo ad altre varianti (793/B) con cui gli animali non sono venuti a contatto.

Da un punto di vista di efficacia del piano vaccinale impiegato, l'associazione di Mass e QX si è dimostrata efficace nel garantire protezione non solo dal genotipo QX, che è stato isolato durante il secondo ciclo in assenza di sintomatologia, ma anche dal genotipo Q1. A seguito dell'infezione da IBV genotipo Q1 infatti si è rilevata solo una sintomatologia molto lieve che non ha richiesto l'impiego di farmaci e non ha inciso sul consumo alimentare degli animali. Questo dato sembra indicare che il concetto del "protectotipo", secondo il quale la vaccinazione con due genotipi diversi di IBV permette l'ampliamento dello spettro di protezione anche ad altri genotipi, già dimostrato per l'associazione Mass-793/B<sup>2</sup>, possa essere valido anche per altre associazioni come Mass-QX. Questo dato è fondamentale per la definizione dei possibili piani vaccinali da impiegare in un'area, come il Nord Italia, dove è presente un genotipo (Q1) per cui non sono stati sviluppati vaccini omologhi e che quindi va controllato mediante vaccinazione con associazione di genotipi diversi. Questo dato andrà in futuro confermato con studi sperimentali specifici effettuati in laboratorio.

Una sintomatologia respiratoria rilevante si è riscontrata nel corso dei due cicli solo in concomitanza dell'infezione da aMPV, e in presenza di segni clinici (teste gonfie) tipici delle forme respiratorie causate da questo patogeno.

In conclusione durante questo monitoraggio si è evidenziata l'efficacia del piano vaccinale che impiega i vaccini IBV Mass e QX per il controllo delle infezioni da IBV di campo genotipi QX e Q1.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Jackwood MD e de Wit S. (2013). Infectious bronchitis. In Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, Diseases of Poultry, 13<sup>o</sup> edizione, Wiley-Blackweel, pp. 139-159.
2. Cook JKA, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB. (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
3. Massi P, Barbieri I, Fiorentini L, Casadio M, Parigi M, Tosi G. (2015). Analisi molecolare di ceppi del virus della Bronchite Infettiva Aviaria negli anni 2013 e 2014. Considerazioni sui genotipi circolanti in Italia e in altri paesi europei ed extra-europei. *Atti SIPA 2015* pp. 220-229.
4. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., C.J. Naylor C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28(6): 593-605.
5. Cecchinato M., Lupini C., Munoz Pogoreltseva O.S., Listorti V., Mondin A., Drigo M., Catelli E. (2013). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathology*, 42(3):283-289.