

## CINETICA DI CEPPI VACCINALI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA E INTERAZIONI CON CEPPI DI CAMPO E METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN ALLEVAMENTI DI BROILER

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Drigo M.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>.

1) *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD) - Italia.*

2) *Ceva Salute Animale, Viale Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB) - Italia*

### Summary

Infectious bronchitis (IB) control is managed through biosecurity measures and vaccine administration. In Italy vaccination has been performed as an association of two genotypes, Mass and 793B-like, following the protectotype concept. Initially the vaccine administration was given in two distinct moments, 14 days apart, while recently both vaccines have been provided at first day of life. To evaluate the vaccine kinetic, 237 samples have been analysed by two different *real-time* RT-PCR specific for Mass-like and 1/96 (IBird®, CEVA). Samples have also been processed for IBV field strains detection and sequencing and aMPV screening. Vaccine kinetic showed a similar trend between the two strains, with long persistence and an analogous decline through the production cycle. 1/96 strain appeared to be slightly more protective than Mass-like ones and the detected field strains (QX, 793B, Q1) emerged mainly during the last period, such as subtype B aMPV positivities. IBV field strains and aMPV coinfections have been detected.

### INTRODUZIONE

La Bronchite Infettiva è uno dei problemi economico-sanitari più rilevanti nel comparto avicolo, mondiale (MaloA et al., 1988, De Wit et al., 2011) e italiano (Beato et al., 2005). Dal primo isolamento negli anni '30 (Jackwood, 2012) del *virus della Bronchite Infettiva* (IBV), un *gammacoronavirus*, ne sono state identificate in tutto il mondo più di 50 varianti (Valastro et al., 2016), con un grado di identità aminoacidica che oscilla dal 75 all'80% (Cavanagh, 2007). Per il controllo di questa patologia si è da subito fatto ricorso alla vaccinazione, appurando però l'inadeguatezza di un protocollo vaccinale basato sull'utilizzo di un solo ceppo di IBV al fine di generare una sufficiente immunizzazione nei confronti delle tante varianti di campo circolanti (Cook et al., 1999). Studi di cross-protezione hanno rivelato come l'associazione di due ceppi vaccinali eterologhi, in due diverse somministrazioni (Terregino et al., 2008) (*priming* e *boosting*, generalmente a 1 e 14 giorni di vita), o in singola somministrazione ad un giorno di vita (Jones et al., 2005, Awad et al., 2016), sia più efficace nella protezione contro ceppi circolanti, eterologhi e omologhi a quelli vaccinali. Questa tipologia di protocollo vaccinale è ampiamente adottata e sfrutta il concetto di "protettotipo" (Raj and Jones, 1996, Cook et al., 1999), quindi la cross-protezione indotta dall'insieme di ceppi antigenicamente dominanti (De Wit, 2000, Terregino et al., 2008). Ragionevolmente, la scelta del protocollo vaccinale e dei ceppi da utilizzare dovrebbe essere basata su evidenze epidemiologiche legate al territorio (Bande et al., 2015). In Italia, i genotipi più frequentemente riscontrati sono il QX, in aumen-

to negli ultimi anni (Franzo et al., 2014), i ceppi Mass-like e 793B, la cui persistenza è imputabile alla vaccinazione (Franzo et al., 2014) e il Q1, identificato per la prima volta in Italia nel 2011 (Toffan et al., 2011). In minor misura sono stati identificati anche i genotipi D274 e IT-02, presente dal 1999 (Dolz et al., 2006) al 2010 (Taddei et al., 2011) ma non più identificato (Franzo et al., 2014).

Ad esacerbare le problematiche respiratorie nel broiler contribuisce anche la crescente diffusione del *Metapneumovirus aviare* (aMPV), riscontrato soprattutto in animali sintomatici a fine ciclo produttivo (Cecchinato et al., 2013a). La comparsa tardiva di questo patogeno ha suggerito un possibile ruolo di *competitors* dei ceppi vaccinali e/o di campo di IBV nell'ostacolare la replicazione (Cavanagh et al., 1999), per quanto situazioni di coinfezione non siano infrequenti.

Questo studio nasce quindi dall'esigenza di verificare e monitorare la presenza dei vaccini somministrati ad inizio ciclo produttivo, per valutare la corretta applicazione e l'efficacia del vaccino medesimo, in termini di replicazione, persistenza e "convivenza" con altri ceppi, vaccinali o di campo. La disponibilità di una visione dell'andamento nel tempo dei titoli virali dei vaccini somministrati ha stimolato curiosità riguardo all'interazione dei due vaccini, alla correlazione dei titoli virali, al legame tra i titoli e l'età degli animali e al ruolo del titolo vaccinale nel prevenire o predisporre l'ingresso di ceppi di campo o di altri patogeni di sempre più frequente riscontro, come aMPV.

## MATERIALI E METODI

### *Campioni*

I campioni analizzati provengono da allevamenti di broiler distribuiti nel Nord Italia. Il protocollo vaccinale delle aziende in esame ha previsto generalmente una doppia vaccinazione (protettotipo) con ceppi Mass-like e 793B-like (1/96, IBird®, CEVA,) ad un giorno di vita. La programmazione del campionamento ha previsto il monitoraggio degli allevamenti in almeno due punti del processo produttivo, ad inizio e a fine ciclo. I campioni sono stati raccolti in pool di 10 tamponi tracheali per allevamento/capannone, lasciati asciugare e poi conservati a -80°C fino a processazione. Per l'estrazione dell'RNA virale i tamponi sono stati stemperati in 2 ml di PBS prima di essere processati con il kit commerciale High Pure RNA Isolation Kit® (Roche).

### *Real-time RT-PCR*

Per la valutazione della cinetica vaccinale dei due ceppi di IBV sono state validate due *real-time* RT-PCR specifiche e distinte, in grado di identificare e quantificare solamente i ceppi vaccinali di interesse, Mass-like e 1/96 (IBird®) rispettivamente. Il disegno dei *primers* e delle sonde si è basato sull'allineamento delle sequenze dei vaccini a sequenze di riferimento, in corrispondenza di regioni variabili e peculiari dei ceppi di interesse. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad entrambe le *real-time* RT-PCR eseguita con il kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen™) per la quantificazione di entrambi i vaccini.

### *Approfondimenti diagnostici*

Almeno un campione per ciclo proveniente da animali oltre i 30 giorni di vita, è stato sequenziato per la ricerca del vaccino e per valutarne la stabilità genetica e inoltre, in presenza di sintomatologia respiratoria e/o aumento della mortalità, i campioni sono

stati processati per la ricerca di varianti di campo di IBV mediante una RT-PCR generica (Cavanagh et al., 1999) utilizzando il kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) e successivo sequenziamento della porzione del gene S1 amplificato, ai fini della classificazione del ceppo identificato. In aggiunta, su parte degli stessi campioni è stata parallelamente effettuata la ricerca di aMPV di tipo A o B con una *multiplex real-time* RT-PCR (Cecchinato et al., 2013b).

#### *Database*

I risultati sono stati organizzati in un database comprendente l'allevamento di provenienza, la data e l'età degli animali al momento del campionamento, le positività e i titoli virali dei due ceppi vaccinali, il genotipo del ceppo eventualmente individuato con RT-PCR e sequenziamento ed infine la positività ad aMPV sottotipo A o B.

#### *Analisi statistiche*

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software *R* e le rispettive librerie, specifiche per ciascuna analisi (Team, 2015). La presenza di una differenza significativa nei titoli dei due vaccini considerati è stata valutata, includendo l'età degli animali come covariata, eseguendo un'analisi della covarianza (ANCOVA), in particolare è stata utilizzata la "robust-ANCOVA" (Wilcox, 2012). L'effetto dei titoli vaccinali Mass-like e 793B nel condizionare la probabilità di infezione con ceppi di campo è stata valutata tramite una regressione logistica. Similmente si è proceduto a valutare un potenziale effetto protettivo dei vaccini IBV nei confronti di aMPV. Infine l'associazione fra l'infezione da aMPV e da ceppi di campo di IBV è stata valutata con un test del *Chi-quadro*. Per tutte le analisi il livello di significatività statistica è stato fissato a 0,05 ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

## **RISULTATI**

### *Real-time RT-PCR*

La validazione delle metodiche è stata condotta su vaccini titolati (con titolo pari a  $5,4 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$  per il vaccino Mass,  $5,5 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$  per il vaccino IBird®) permettendo di ottenere un *limit of detection* (LOD) di  $0,2 \text{EID}_{50}/\text{ml}$  di RNA virale, verificato mediante l'analisi di diluizioni seriali in base 10 del vaccino target della *real-time* RT-PCR specifica.

### *Campioni*

Sono stati titolati e analizzati 237 campioni mediante le due *real-time* RT-PCR specifiche per i vaccini Mass-like e IBird®. Il 91,56% dei campioni è risultato positivo per il vaccino IBird®, mentre l'81,99% per Mass. Gli approfondimenti diagnostici per la ricerca di ceppi di campo sono stati effettuati su 99 (41,77%) campioni, di cui 56 (56,56%) hanno restituito sequenze ascrivibili ad uno dei vaccini somministrati, 22 (22,22%) appartengono al genotipo QX, 15 (15,15%) sono ceppi 793B distinti dal vaccino IBird®, 5 (5,05%) sono Q1 e 1 (1,01%) è stato identificato come ceppo ricombinante. Ottantotto (37,13%) campioni sono stati testati per aMPV, le cui positività (33, 37,13%) sono tutte ascrivibili ad aMPV sottotipo B.

### Analisi

Le negatività dei titoli vaccinali si localizzano prevalentemente nei primissimi giorni (fino al 3° giorno) e a partire dal 36° giorno del ciclo produttivo, rispecchiando un trend decrescente analogo per entrambi i vaccini che appare in funzione dell'età (Fig. 1). Emerge una differenza significativa nei titoli virali tra i due vaccini, con il vaccino Mass che mostra inizialmente titoli più alti ma un successivo calo più rapido e marcato con il progredire dell'età degli animali. Ciò evidenzia un'interazione statisticamente significativa tra il singolo genotipo vaccinale e l'età, nel condizionare i titoli virali.

Lo studio dei titoli vaccinali in relazione agli esiti del sequenziamento ha messo in luce la netta diminuzione dei titoli rilevati nei campioni risultati positivi al ceppo di campo, rispetto ai campioni in cui questo non è stato riscontrato (Fig. 2a). La differenza risulta più significativa nel caso del vaccino IBird, dove titoli inferiori sono più frequentemente associati alla presenza di ceppi di campo. I titoli di IBird si mantengono inoltre entro un *range* più ridotto a differenza del Mass, non raggiungendo però valori bassi quanto quest'ultimo (Fig. 2a). Il riscontro di ceppi di campo tra i campioni testati inizia a partire dal 35° giorno di età degli animali; è infatti possibile osservare come la densità delle sequenze vaccinali sia uniformemente distribuita nell'intero arco temporale del ciclo produttivo mentre quella dei ceppi di campo sia concentra nella seconda fase (Fig. 2b). Ciò si osserva in corrispondenza dell'inizio del calo dei titoli del vaccino IBird®, mentre per il Mass si individuano anche sporadiche positività con titoli vaccinali elevati (Fig. 2b).

Anche aMPV è stato identificato a partire dal 35° giorno di ciclo produttivo (Fig. 3a) e in 12 campioni è risultato associato a ceppi di campo di IBV, 6 dei quali QX. **È stata valutata la** relazione tra i titoli dei due vaccini e la presenza di aMPV sottotipo B, che ha evidenziato almeno graficamente come i titoli dei campioni aMPV-positivi siano lievemente inferiori e di nuovo più marcatamente nel caso dell'IBird (Fig. 3b), mentre non si riscontra un'associazione statisticamente significativa tra le positività ad aMPV e IBV di campo.

### DISCUSSIONE

Il protocollo vaccinale adottato dalle aziende oggetto di questo studio ha previsto la somministrazione al primo giorno di vita dei ceppi vaccinali Mass-like e 793B-like. Alcune osservazioni in letteratura suggeriscono come la somministrazione separata dei due vaccini, a distanza di 14 giorni, sia più utile dal punto di vista del recupero funzionale dell'epitelio tracheale, che garantirebbe una più idonea risposta alla stimolazione antigenica. Tuttavia gli svantaggi gestionali della seconda vaccinazione in campo, come la disomogeneità della somministrazione o la vaccinazione di animali non più in condizioni sanitarie ottimali, potrebbero inficiarne i risultati (De Wit and Cook, 2014). Con l'utilizzo in campo di questa nuova strategia vaccinale si è voluto valutare il comportamento dei due vaccini somministrati ad un giorno di vita. I titoli virali vaccinali osservati in questo studio propongono l'esistenza di un'effettiva differenza nella cinetica dei due vaccini somministrati, con la capacità di raggiungere titoli diversi al momento del monitoraggio ma mostrando comunque una costante compresenza e un andamento simile nel tempo, senza quindi suggerire un effetto competitivo tra i due ceppi. È interessante notare come il ceppo 1/96 (IBird®), che raggiunge titoli leggermente inferiori ma che risulta più persistente,

sembri avere però un'azione maggiormente protettiva contro l'ingresso di ceppi di campo, rispetto ai ceppi Mass-like imputabile ad un effetto competitivo dovuto alla prolungata presenza vaccinale e alla protezione più efficace nei confronti del genotipo QX proposta in altri studi (Awad et al., 2016).

Il ritrovamento di sequenze sempre identiche del ceppo vaccinale IBird® lungo tutta la durata del ciclo produttivo ne ha permesso la comparazione, confermando la stabilità genetica del vaccino. Le sequenze di campo identificate mostrano una predominante circolazione del genotipo QX, prevalentemente in associazione a sintomatologia respiratoria, sebbene non si possa escludere una distorsione delle stime dovuta alla tipologia di campionamento adottata.

Gli animali sono stati campionati maggiormente nel primo periodo del ciclo produttivo, per la verifica dell'avvenuta vaccinazione e dell'inizio della replicazione virale, e successivamente nell'ultima fase, per il controllo della persistenza vaccinale e per la ricerca di patogeni in relazione alla sintomatologia riscontrata. Questo orientamento può aver introdotto un bias che si riflette in una sottostima delle positività a ceppi di campo o ad aMPV, o alla mancata identificazione del reale momento d'ingresso dei virus, per la scarsità dei campioni raccolti a metà del ciclo produttivo. La cinetica vaccinale non risente di questo fenomeno perché i grafici e le analisi statistiche permettono di stimare che l'andamento decrescente dei titoli vaccinali continui con lo stesso *trend* anche nel periodo di calo dell'intensità del campionamento.

In relazione alla ricerca di aMPV, la presenza di questo patogeno si attesta in svariati allevamenti, come la presenza di coinfezioni con ceppi di IBV nell'ultimo periodo del ciclo produttivo, indebolendo l'ipotesi dell'azione competitiva fra questi patogeni (Cecchinato et al., 2013a, Cavanagh et al., 1999). Tale evidenza sembra però essere confermata dalla minor presenza di aMPV in corrispondenza del primo periodo del ciclo produttivo, in cui i titoli vaccinali di IBV sono maggiori. Se questo riscontro sia effettivamente riconducibile all'interazione tra virus vaccinali e di campo potrà essere confermato solamente da ulteriori studi.

## CONCLUSIONI

Il protocollo vaccinale che prevede l'associazione di ceppi Mass-like e 1/96 (IBird®, CEVA) e la somministrazione al primo giorno di vita, mostra il raggiungimento e il mantenimento di titoli virali elevati per entrambi i vaccini con una buona persistenza durante il ciclo produttivo, fattore da considerare nella competizione tra ceppi vaccinali e di campo. I due vaccini sono in grado di replicare contemporaneamente senza prevalere uno sull'altro. Questo studio ha permesso inoltre di identificare episodi di coinfezione tra IBV e aMPV sottotipo B.

## BIBLIOGRAFIA

Awad, F., Hutton, S., Forrester, A., Baylis, M., Ganapathy, K., 2016. Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathol.* 45, 169-177.

Bande, F., Arshad, S.S., Hair Bejo, M., Moeini, H., Omar, A.R., 2015. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *Journal of immunology research* 2015.

Beato, M., Terregino, C., Nardi, R.D., Toffan, A., Cattoli, G., Capua, I., 2005. Epidemiological study on circulation of infectious bronchitis virus strains in North Eastern Italy [Lombardy; Veneto]. *Italian Journal of Animal Science (Italy)* .

Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., Naylor, C., 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28, 593-605.

Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38, 281-297.

Cecchinato, M., Drigo, M., Lupini, C., Martini, M., Listorti, V., Franzo, G., Bonci, M., Laconi, A., Morandini, E., Catelli, E., 2013a. Field survey of avian metapneumovirus in Northern Italy. *Large Animal Review* 19, 267-270.

Cecchinato, M., Lupini, C., Munoz Pogoreltseva, O.S., Listorti, V., Mondin, A., Drigo, M., Catelli, E., 2013b. Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathol.* 42, 283-289.

Cook, J.K., 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 bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477-485.

De Wit, J., 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29, 71-93.

De Wit, J., Cook, J.K., 2014. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol.* 43, 485-497.

De Wit, J., Cook, J.K., Van der Heijden, Harold MJF, 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223-235.

Dolz, R., Pujols, J., Ordóñez, G., Porta, R., Majó, N., 2006. Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathol.* 35, 77-85.

Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E., Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine* 32, 6765-6767.

Jackwood, M.W., 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56, 634-641.

Jones, R., Worthington, K., Capua, I., Naylor, C., 2005. Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Veterinary Record-English Edition* 156, 646-647.

MaloA, A., OrbellB, S., HugginsB, M., WoodsB, M., CookB, J., 1988. Cross protection studies after the use of live-attenuated IBV vaccines Nobilis® IB 4-91 and Nobilis® IB Ma5 (Massachusetts type). Intervet, VSD Newsletter 17, 1-6.

Raj, G.D., Jones, R., 1996. Protectotypic differentiation of avian infectious bronchitis viruses using an in vitro challenge model. *Vet. Microbiol.* 53, 239-252.

Taddei, R., Tosi, G., Barbieri, I., Fiorentini, L., Massi, P., Boniotti, B., 2011. Caratterizzazione molecolare dei ceppi del virus della Bronchite Infettiva aviaria in Italia: aggiornamento sui dati raccolti nel corso dell'anno 2010. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 50 Convegno annuale Società Italiana Patologia Aviaria (SIPA).

Team, R.C., 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012). URL: <http://www.R-project.org>.

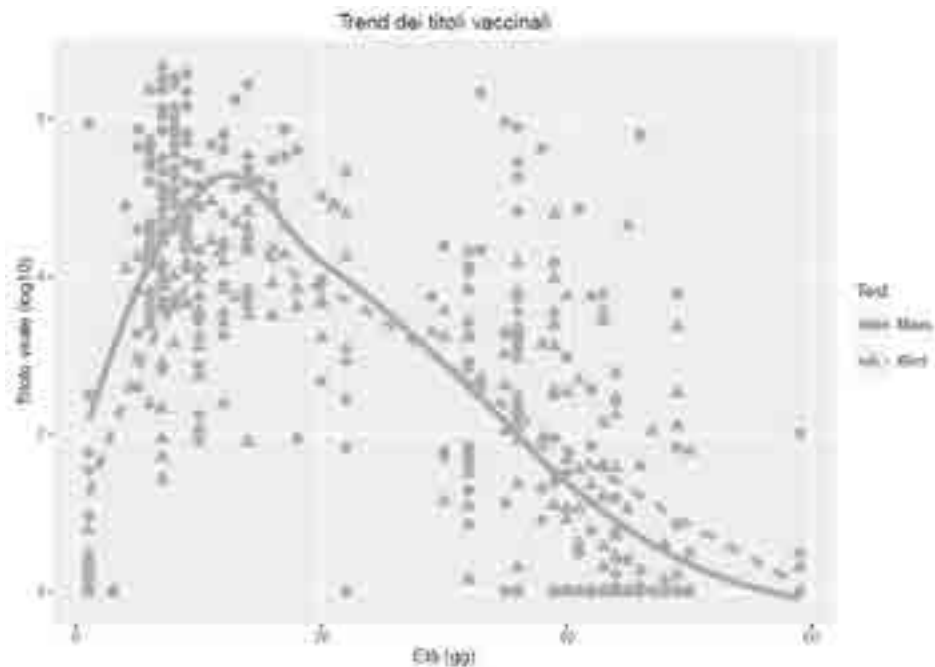
Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M., Capua, I., 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 37, 487-493.

Toffan, A., Terregino, C., Mazzacan, E., Castaldello, I., Capua, I., Bonci, M., 2011. Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Vet. Rec.* 169, 212-213.

Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I., 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution* 39, 349-364.

Wilcox, R.R., 2012. Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing. Academic Press.

**Figura 1.** Andamento e confronto dei titoli vaccinali Mass-like e IBird® in funzione dell'età degli animali.



**Figura 2.:** a-b) Confronto tra titoli vaccinali e risultati del sequenziamento.

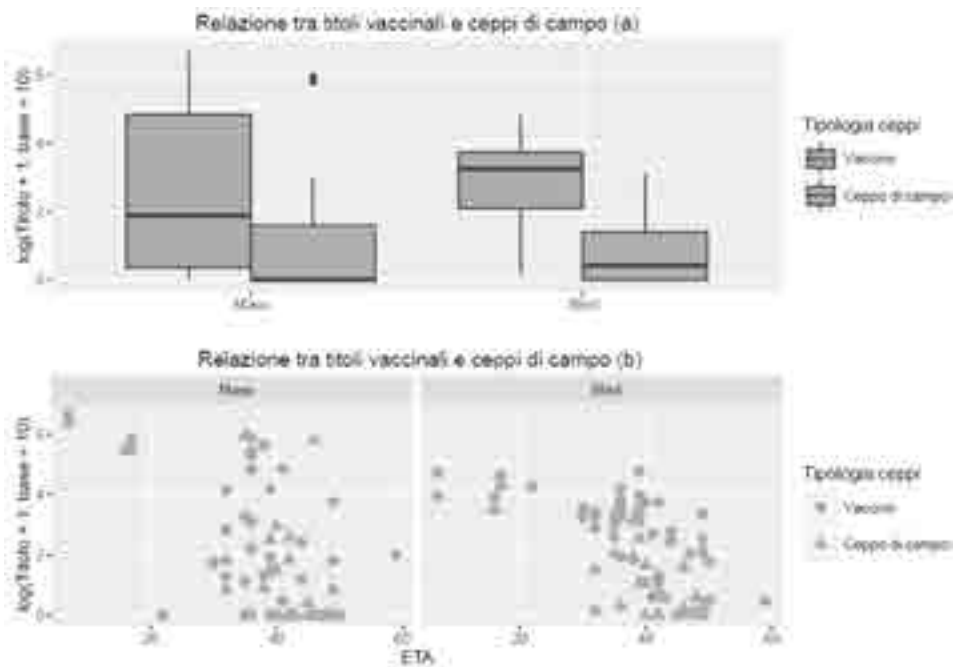




Figura 3.: a-b) Confronto tra i titoli vaccinali di campioni aMPV negativi e positivi.

