

Ojkić D1, Krell PJ, Tuboly T, Nagy E. 2008. Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada. *Can J Vet Res.* 72(3):236-41.

Reece RL, Pass DA. 1986. Inclusion body pancreatitis in guinea fowl (*Numida meleagris*). *Aust Vet J.* 63(1):26-7.

Toffan A, Catania S, Salviato A, De Battisti C, Vascellari M, Toson M, Capua I, Cattoli G. 2012. Experimental infection of poults and guinea fowl with genetically distinct avian astroviruses. *Avian Pathol.* 41(5):429-35.

Zellen GK, Key DW, Jack SW. 1989. Adenoviral pancreatitis in guinea fowl (*Numida meleagris*). *Avian Dis.* 33(3):586-9.

COMPARAZIONE DELL'EFFICACIA PROTETTIVA DI UN PROTOCOLLO VACCINALE TRADIZIONALE PER NDV RISPETTO AD UNA SINGOLA SOMMINISTRAZIONE DI UN VACCINO RICOMBINANTE HVT-NDV IN TACCHINI DA CARNE A FINE CICLO

Mazzetto E.¹, Bonfante F.¹, Salomoni A.¹, Boscolo L.¹, Maniero S.¹, Meini A.², Berto G.², Terregino C.¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*; ² *Ceva Salute Animale S.p.A.*

Summary

Newcastle disease (ND) is one of the most important poultry diseases, and it causes significant economic losses to the poultry industry. In many countries, prophylactic vaccination is applied to prevent and reduce the circulation of Newcastle disease virus (NDV). However, despite the extensive active immunization with inactivated and/or live attenuated vaccines, outbreaks have been reported in many parts of the world. To overcome some of the limitations associated with current vaccination approaches, new recombinant ND vaccines have been developed.

Among these, the Turkey Herpesvirus (HVT) vector has been recently engineered to express the NDV fusion protein. This novel vaccine appears to have uniquely advantageous characteristics, such as the abilities to elicit strong cell-mediated immunity along with humoral immunity, to be less affected by maternally derived antibodies and to replicate for months inside the host upon a single administration, constantly boosting the immune response.

In this study, the efficacy of a single shot of a commercial HVT-ND vaccine at the hatchery is compared with a traditional immunization program for ND in meat turkeys that consist of a live vaccine administered by drinking water within the first week and a shot with an inactivated vaccine at about 25 days of age. Irrespective of the immunization protocol, female and male turkeys at the end of their commercial life were fully clinically protected against a velogenic NDV strain. The overall equivalence between the protective performances of the HVT-ND and the traditional ND vaccination indicate this vaccine as a promising alternative for the protection of meat turkeys up to the end of their productive cycle.

INTRODUZIONE

La malattia di Newcastle (ND) è una tra le patologie virali più diffuse al mondo e l'entità dei danni che può provocare in termini di perdite economiche nella filiera avicola è comparabile a quella di malattie quali l'influenza aviaria e la bronchite infettiva (Kapczynski et al., 2013). In Italia la vaccinazione profilattica è divenuta obbligatoria a seguito dell'epidemia di NDV nel 2000 (Capua, et al., 2002), e successivamente il Ministero della Salute con nota 0005266-03/03/2015-DGSAF ha rinnovato la gestione del piano vaccinale definendo l'utilizzo di vaccini vivi attenuati, inattivati o combinazioni di essi in funzione della specie e della tipologia produttiva. Questi schemi di vaccinazione presentano tuttavia alcune criticità; la modalità di somministrazione e l'interferenza degli anticorpi materni, per esempio, sono fattori che spesso ne compromettono l'efficacia. Inoltre, mentre da una parte i vaccini vivi per ND possono, in alcuni contesti, favorire l'insorgenza di forme respiratorie;

dall'altra i vaccini spenti comportano non solo un significativo aumento dei costi legati alla manodopera, soprattutto in animali di grandi dimensioni come il tacchino da carne, ma anche un incremento del rischio di introduzione in azienda di altri patogeni tramite il personale delle squadre di vaccinazione.

Le nuove tecnologie in campo farmaceutico hanno messo a disposizione un vaccino ricombinante che utilizza l'Herpesvirus dei tacchini (HVT) come vettore per l'espressione del gene della proteina di fusione (F) dell'NDV (Palya et al., 2012). Tale vaccino sfrutta la capacità dell'HVT di replicare nei linfociti e di persistere all'interno dell'ospite determinando così un costante stimolo antigenico a seguito di una unica somministrazione (Palya et al., 2014). Inoltre, grazie a questo meccanismo, il vaccino HVT-ND conferisce un'immunità di tipo cellulo-mediata oltre che umorale (Esaki et al., 2013).

In questo studio abbiamo valutato in tacchini da carne a fine ciclo l'efficacia protettiva della vaccinazione con l'HVT-ND rispetto ad un protocollo vaccinale per ND comunemente utilizzato in campo. Due gruppi di tacchini, maschi e femmine, sono stati suddivisi a seconda della vaccinazione ricevuta nelle rispettive aziende, ovvero secondo schema tradizionale o con HVT-ND, e successivamente infettati con una dose letale di un ceppo velogeno di NDV.

MATERIALI E METODI

Animali, protocolli vaccinali, virus e disegno sperimentale.

Gli animali utilizzati ai fini della sperimentazione sono stati tacchini da carne femmine e maschi, forniti da due aziende distinte tra loro per localizzazione e tipologia di programma vaccinale applicato. Un'azienda ha applicato uno schema vaccinale comunemente utilizzato in campo basato su una somministrazione di un vaccino vivo con acqua da bere a 5 giorni di vita, seguita da un richiamo con vaccino inattivato per via sottocutanea a 26 giorni di età. Tale protocollo è indicato in questo studio come schema di vaccinazione tradizionale (vacTRAD). L'altra azienda ha utilizzato un vaccino ricombinate HVT per NDV (Vectormune® HVT NDV, Ceva, France), tramite un'unica somministrazione per via sottocutanea subito dopo la schiusa. Questo protocollo è indicato nel testo come HVT. I tacchini di entrambe le aziende sono stati prelevati al termine dei rispettivi cicli produttivi, all'età di 100 giorni per le femmine e 145 giorni per i maschi, trasferiti negli stabulari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) ed accasati in isolatori a pressione negativa con filtri HEPA. Ogni azienda ha fornito 10 femmine e 8 maschi, per un totale di 20 e 16 soggetti per genere. Un gruppo di 7 tacchini di 6 settimane, non vaccinati per NDV è stato utilizzato come controllo per il challenge. Trascorso il tempo necessario all'adattamento in isolatore, i tacchini sono stati sottoposti ad un primo prelievo di sangue per la quantificazione del titolo anticorpale contro NDV nel periodo immediatamente precedente l'infezione; successivamente tutti gli animali sono stati infettati tramite somministrazione oculo-nasale di 200 µl di liquido allantoideo a una dose di 10^7 EID₅₀. Il virus utilizzato per il challenge è il ceppo velogeno (vNDV) Hertz 33/56 (di seguito indicato come Hertz). I gruppi sono stati monitorati quotidianamente per una valutazione clinica, mentre la raccolta dei tamponi tracheali e cloacali è avvenuta a 2, 4 e 7 giorni post-infezione (p.i.). A 21 giorni p.i. è stato eseguito un secondo prelievo di sangue ai fini di valutare l'incremento del titolo anticorpale. La sperimentazione è stata condotta in ottemperanza con

quanto previsto dal D.Lgs 26/2014 e dalle linee guida nazionali ed internazionali sul benessere animale, previo parere favorevole del comitato etico dell'IZSVe.

Sierologia

Il test di inibizione dell'emoagglutinazione è stato eseguito utilizzando il virus di challenge secondo le procedure ufficiali del manuale OIE (Edition, 2012). I sieri sono stati inoltre testati con metodica ELISA tramite il kit commerciale ID Screen® Newcastle Disease Indirect-IDvet. I titoli anticorpali dei sieri testati con il kit ELISA sono stati estrapolati utilizzando un software fornito dalla ditta IDvet.

Virologia

I tamponi sono stati processati per effettuare l'estrazione dell'RNA virale con il kit Mag MAX™-96 AI/ND. Gli estratti sono stati quantificati come copie genomiche virali attraverso una rRT-PCR quantitativa (qrRT-PCR) per il gene L di NDV. Per la quantificazione è stata generata una curva standard utilizzando diluizioni seriali di RNA virale sintetico espresse in copie genomiche/µl. Il trascritto del RNA sintetico è stato ottenuto in vitro con il kit MEGAscript T7 transcription Kit (Ambion®, Austin, TX, USA), utilizzando come modello genomico il ceppo Hertz di NDV.

Analisi statistica

Nell'analisi statistica si è tenuto conto della natura non indipendente dei dati e dell'impossibilità di definirne una distribuzione normale a causa della numerosità campionaria. Per il confronto si è quindi utilizzato il test di Wilcoxon-Mann-Whitney, un test non parametrico per campioni appaiati. Qualora sottogruppi di dati di interesse siano risultati seguire una distribuzione normale e/o rispettare i postulati di omoschedasticità, test parametrici quali ANOVA e *t-student* sono stati applicati per il loro confronto. Per tutte le analisi il livello di significatività statistica è stato fissato a 0.05 (*p-value* <0.05).

RISULTATI

Gruppo controllo

L'infezione dei tacchini del gruppo controllo ha causato il 100% di mortalità entro 7 giorni p.i. Durante il decorso della malattia sono stati osservati sintomi riconducibili a ND, quali ottundimento del sensorio, dispnea, diarrea verdastra e una grave sintomatologia nervosa costituita da tremori, difficoltà nella deglutizione e perdita di equilibrio e stereotipie motorie.

Tacchini: femmine

Al prelievo precedente l'infezione, i titoli anticorpali medi delle femmine a 100 giorni di età del gruppo vacTRAD sono risultati maggiori rispetto al gruppo HVT (Tab.1). Sia gli animali del gruppo vacTRAD sia del gruppo HVT hanno superato il challenge senza manifestare sintomatologia. Nel gruppo vacTRAD tutti i tamponi sono risultati negativi alla qrRT-PCR, mentre nel gruppo HVT sono state rilevate positività genomiche nei tamponi tracheali di due animali a 4 giorni p.i., e nel tampone tracheale di uno di questi animali a 7 giorni p.i. L'esito negativo delle prove di isolamento in uova embrionate ha indicato la non infettività dei campioni positivi in qrRT-PCR. Ciascuna delle metodiche sierologiche utilizzate ha evidenziato in entrambi i gruppi un rialzo significativo dei titoli anticorpali p.i. (Fig.1a; Tab.1).

Tacchini: maschi

I titoli anticorpali medi rilevati prima del challenge sono risultati maggiori nel gruppo vacTRAD rispetto al gruppo HVT (Tab.2).

Nessun segno clinico riconducibile a NDV è stato riscontrato lungo la durata della prova. Tutti i campioni virologici sono risultati negativi alla qrRT-PCR. In entrambi i gruppi, le metodiche sierologiche non hanno rivelato alcun aumento significativo dei titoli anticorpali in seguito all'infezione; al contrario si è evidenziato un calo statisticamente significativo dei titoli anticorpali del gruppo vacTRAD (Fig.1b).

Il confronto dei titoli anticorpali pre-infezione dei maschi e delle femmine ha evidenziato come i maschi, a parità di protocollo vaccinale presentavano valori più alti rispetto a quelli delle femmine, con significatività maggiore negli animali dei gruppi HVT (Fig. 2a). La stessa tipologia di confronto è stata utilizzata per comparare la variabilità dei titoli anticorpali pre-infezione: la deviazione standard tra maschi e femmine è risultata significativamente differente soltanto negli animali vaccinati tradizionalmente (Fig.2b), indicando una maggiore omogeneità nel titolo anticorpale dei soggetti maschi a fine ciclo rispetto alle femmine.

DISCUSSIONE

Il vaccino ricombinante HVT-ND, al pari del protocollo vaccinale tradizionale, ha protetto clinicamente entrambi i gruppi dal challenge. Nelle femmine la vaccinazione non ha comportato una totale refrattarietà all'infezione in quanto si è registrato un rialzo dei titoli nel 70 e 80% dei soggetti, rispettivamente per il gruppo vacTRAD e quello HVT. Questo dato ha trovato conferma nella positività al genoma virale rilevata nei tamponi di due animali del gruppo HVT.

Nei gruppi di maschi, oltre ad una completa protezione clinica, si è osservata una protezione vaccinale in grado di neutralizzare la replicazione virale, in quanto tutti i tamponi sono risultati negativi e non è stato registrato incremento dei titoli anticorpali in alcun soggetto. La performance migliore registrata nei gruppi di maschi rispetto alle femmine risulta coerente con i maggiori titoli anticorpali rilevati precedentemente al challenge virale a prescindere dal protocollo vaccinale adottato, infatti, i titoli anticorpali medi delle femmine sono risultati sempre inferiori a quelli dei maschi e nel caso delle femmine del gruppo vacTRAD anche più disomogenei.

CONCLUSIONE

Questo è il primo studio di challenge di un vaccino ricombinante HVT-ND in tacchini da carne a fine ciclo. La somministrazione di una singola dose al primo giorno di vita ha protetto i tacchini da malattia clinica al pari della vaccinazione tradizionale. Nei tacchini maschi il vaccino HVT ha indotto un'immunità sterilizzante verso un'infezione da virus altamente patogeno, mentre nelle femmine la replicazione virale è stata fortemente ridotta, risultando solo nell'eliminazione di materiale genetico virale non infettante in un numero ridotto di animali. La sostanziale equivalenza dell'efficacia protettiva dei protocolli vaccinali testati, indica il vaccino HVT-ND come un presidio immunizzante alternativo o complementare alle somministrazioni di vaccini vivi tradizionali attenuati ed inattivati attualmente adottate negli allevamenti di tacchini.

Tab.1 Esami sierologici nelle femmine: titolo anticorpale medio per gruppo vaccinale nel pre e nel post-infezione e tasso di sieroconversione.

	Titolo anticorpale in ELISA		Titolo anticorpale in HI (log2)		Sieroconversione (>2log2)
	Pre-infezione	Post-infezione	Pre-infezione	Post-infezione	N°animali/tot
Vaccinati tradizionalmente	9283,28	15117,86	4,3	6,8	7/10
Vaccinati HVT-NDV	5851,51	13818,01	2,7	5,2	8/10

Tab.2 Esami sierologici nei maschi: titolo anticorpale medio per gruppo vaccinale nel pre e nel post-infezione e tasso di sieroconversione.

	Titolo anticorpale in ELISA		Titolo anticorpale in HI (log2)		Sieroconversione (>2log2)
	Pre-infezione	Post-infezione	Pre-infezione	Post-infezione	N°animali/tot
Vaccinati tradizionalmente	17459,37	16264,23	8,8	7,7	0/7
Vaccinati HVT-NDV	14213,36	15534,86	5,2	6,2	0/5

Fig.1 Titoli anticorpali in ELISA e in HI (log2) dei gruppi vaccinali, e analisi statistica: a) gruppo delle femmine b) gruppo dei maschi.

* Significativamente per valori di p< 0,05, ** Significativamente per valori di p< 0,01, *** Significativamente per valori di p< 0,001.

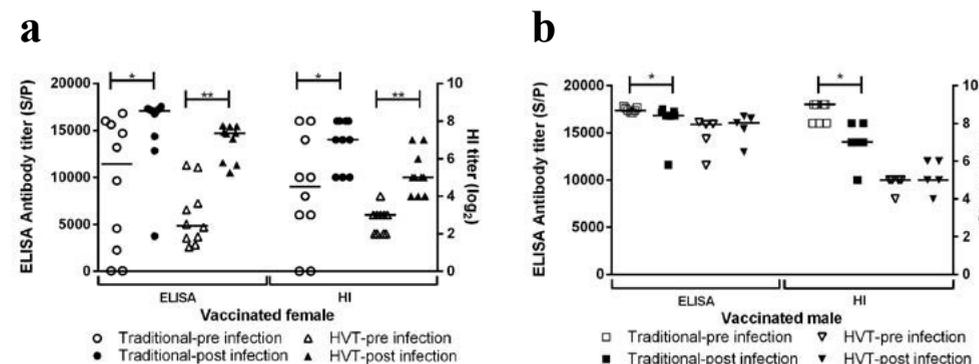
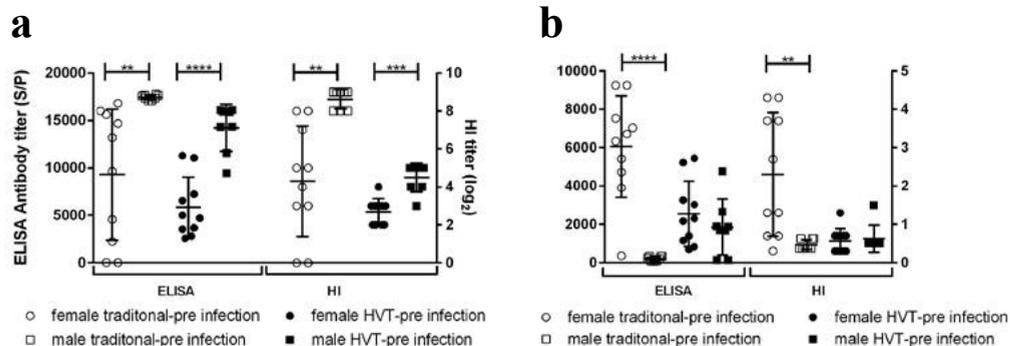


Fig.2 a) Titoli anticorpali in ELISA e in HI (log2) dei gruppi vaccinali, e analisi statistica; b) Deviazioni di ciascun titolo anticorpale (in ELISA e in HI) dalla media del gruppo di appartenenza.

* Significativamente per valori di $p < 0,05$, ** Significativamente per valori di $p < 0,01$, *** Significativamente per valori di $p < 0,001$.



BIBLIOGRAFIA

- Capua, I., Dalla, P. M., Mutinelli, F., Marangon, S., & Terregino, C. (2002). Newcastle disease outbreaks in Italy during 2000. *The Veterinary Record*, 150(18), 565–8. <https://doi.org/10.1136/vr.150.18.565>
- OIE Terrestrial Manual, Edition 2012. *Chapter 2.3.14 Newcastle Disease (infection with Newcastle Disease virus)*.
- Esaki, M., Godoy, A., Rosenberger, J. K., Rosenberger, S. C., Gardin, Y., Yasuda, A., & Dorsey, K. M. (2013). Protection and antibody response caused by turkey herpesvirus vector Newcastle disease vaccine. *Avian Diseases*, 57(4), 750–755. <https://doi.org/10.1637/10540-032613-Reg.1>
- Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., & Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
- Palya, V., Kiss, I., Tatár-Kis, T., Mató, T., Felföldi, B., & Gardin, Y. (2012). Advancement in Vaccination Against Newcastle Disease: Recombinant HVT NDV Provides High Clinical Protection and Reduces Challenge Virus Shedding with the Absence of Vaccine Reactions. *Avian Diseases*, 56(2), 282–287. <https://doi.org/10.1637/9935-091511-Reg.1>
- Palya, V., Tatár-Kis, T., Mató, T., Felföldi, B., Kovács, E., & Gardin, Y. (2014). Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158(1–2), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.11.008>

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UNA MISCELA DI ACIDI ORGANICI E FITOTERAPICI NEL CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA *ESCHERICHIA COLI* NEL TACCHINO

Parigi M.¹, Massi P.¹, Fiorentini L.¹, Tosi G.¹, Romboli C.¹, Vandi L.², Bocciero R.¹, Fregnani G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì;

²Biomim Holding GmbH, Industriestrasse 21, 3130 Herzogenburg, Austria

ABSTRACT

Colibacillosis is a systemic multifactorial disease caused by *E. coli* that still represents a major problem in the turkey industry worldwide. The aim of the present study was to test the effects of an enhanced feed acidifier on the replication of an antibiotic resistant *E. coli*. Ninety-six turkey poults of one day of age were randomly assigned to 4 poultry isolators (24 animals/isolator), fed with 4 different dietary treatments for 30 days and orally challenged with $1,38 \times 10^8$ cfu/mL of an antibiotic resistant *E. coli* strain. At day 20 and day 30, birds were euthanized in order to evaluate the presence of gross lesions of colibacillosis and an aliquot of their intestinal content and liver has been examined by bacteriological analysis. At any interval of the trial, birds of Group 2, treated with the highest dosage of acidifier, presented a lower *E. coli* population, both in the intestine and in the liver than the other groups and absent or mild lesions of colibacillosis. Thus, since feed acidifiers are included in poultry diets as alternative to antibiotic growth promoters, this *E. coli* reduction could lead to a reduced environmental contamination and, consequently, limit the horizontally diffusion of the pathogen.

INTRODUZIONE

Con colibacillosi si intende una malattia sistemica multifattoriale causata da *E. coli* che rappresenta, ancora oggi, una delle maggiori problematiche nell'allevamento dei tacchini a livello mondiale, a causa delle gravi conseguenze in termini di mortalità e ridotta conversione alimentare dei gruppi colpiti. La malattia si può presentare con diverse forme cliniche, quali colisetticemia, aereosacculite, perepatite e percardite. La frequenza e la gravità dell'infezione dipendono da tre fattori principali: lo stato sanitario del gruppo di animali, la presenza di fattori ambientali predisponenti e la virulenza del ceppo di *E. coli* coinvolto. Nonostante gli antibiotici siano stati, e sono tutt'ora, utilizzati per contrastare la replicazione del batterio, è necessario sia ridurre il loro utilizzo sia identificare valide sostanze alternative, in relazione al crescente numero di ceppi di *E. coli* antibiotico resistenti isolati proprio in corso di focolai di malattia (Huff et al., 2013). Lo scopo di questo studio è stato, quindi, quello di testare e valutare, *in vivo*, gli effetti di un acidificante alimentare potenziato sulla replicazione di un *E. coli* antibiotico resistente.

MATERIALI E METODI

Progettazione dello studio. Novantasei tacchini di un giorno di età (femmine, Big 6 Aviagen®) sono stati assegnati random a 4 isolatori (24 animali in ogni isolatore) corrispondenti a 4 diverse diete; in ogni isolatore, 4 animali non sono stati identificati. L'acqua e l'alimento somministrati agli animali sono stati testati per l'assenza di *E.*