

# VALUTAZIONE DELLA CINETICA DI CEPPI VACCINALI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA SOMMINISTRATIVA VIA GELA BROILER DI UN GIORNO DI VITA

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Bianco A.<sup>1</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Ramon G.<sup>3</sup>, Paulet P.<sup>3</sup>, Koutoulis K.C.<sup>4</sup>, Drigo M.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Ceva Salute Animale, Viale Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB), Italia

<sup>3</sup> Ceva Santé Animale, 10 Avenue de la Ballastiere, 33500 Libourne, Francia

<sup>4</sup> Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Thessaly, Trikalon 224, 43100 Karditsa, Grecia

## Summary

Infectious bronchitis control requires great efforts and is extremely impacting on management and productivity. For this reason, a careful evaluation of vaccination procedures and protection mechanisms should be mandatory, as new vaccination strategies or delivery methods are proposed. This study aimed to explore B-48 and 1/96 strain kinetics after vaccination by gel administration and compare it with previously obtained vaccine kinetics of vaccines administered by spray. Based on our results, no differences related to the administration route were demonstrated, being gel administration able to guarantee a good coverage and efficient vaccine replication. As a secondary study objective, the relationship between viral titers detected in individual swab samples and pooled swab ones was investigated, displaying the pooled sample tendency to mirror the highest individual swab titer.

## INTRODUZIONE

La Bronchite infettiva (BI) è una delle patologie di maggiore impatto economico in ambito avicolo (Cavanagh & Gelb, 2012), sia dal punto di vista produttivo e della salute animale, con vistosi cali di produzione e compromissione delle performance, sia del management, che si avvale di articolate misure di profilassi e dell'associazione di differenti ceppi vaccinali per assicurare un più ampio spettro di protezione (Jordan, 2017), nei confronti dell'elevata variabilità del virus della Bronchite infettiva (IBV). Una delle combinazioni più comunemente adottate in Italia e in Europa (Franzo et al., 2016), sulla base di una comprovata efficacia nei confronti di svariati ceppi di campo (Cook et al., 1999), prevede un vaccino basato sul genotipo Mass (H120, M41, Ma5) associato a uno appartenente al genotipo 793/B (1/96, 4/91, CR88), o QX (Franzo et al., 2016). Per ragioni di incompatibilità chimica (Collett, 2013), o per motivi commerciali e legali, talvolta la somministrazione in unica soluzione di due vaccini per via spray non può essere effettuata in incubatoio ad un giorno di vita. Per ovviare a questi limiti è necessario prevedere l'esecuzione di due somministrazioni separate ma consecutive in incubatoio, oppure somministrare la seconda vaccinazione all'arrivo in azienda, pur riconoscendo i limiti pratici intrinseci di questa procedura (Collett, 2013), oltre alla sua onerosità in termini di tempo e manodopera. In aggiunta, una minor copertura vaccinale della popolazione è stata associata a quest'ultima strategia (Yegani & Butcher, 2009), predisponendo quindi ad una maggiore suscettibilità ad eventuali ceppi di campo in ingresso o a reversione a virulenza dei ceppi vaccinali stessi (McKinley

et al., 2008). Soprattutto per l'immunizzazione del pollo da carne, una corretta attuazione del protocollo vaccinale con la somministrazione dei due vaccini ad inizio ciclo potrebbe essere sufficiente a garantire un'elevata e duratura protezione. A tale riguardo, la vaccinazione tramite gel introduce un mezzo che può garantire la stessa rapidità operativa della vaccinazione spray e nel contempo la stabilità dei vaccini in caso di somministrazione contemporanea, come già osservato per i vaccini per la coccidiosi (Chapman et al., 2002) e la malattia di Newcastle (Al-Attar & Lee, 2011). Per esaminare l'applicabilità della vaccinazione gel alla profilassi della Bronchite infettiva, è stata quindi pianificata una prova sperimentale che permettesse di valutare la replicazione virale a livello di epitelio respiratorio nel singolo animale, la copertura vaccinale degli animali e i trend dei titoli virali a livello di popolazione. I risultati ottenuti sono stati inoltre confrontati con i dati già presenti sulla cinetica di vaccini analoghi, somministrati via spray (Tucciarone et al., 2018).

## MATERIALI E METODI

### *Trial clinico*

Per la prova sperimentale, sono stati selezionati 500 pulcini Ross 308, femmine di un giorno di vita, provenienti da riproduttori vaccinati contro il virus della Bronchite infettiva e un livello omogeneo di anticorpi materni, con un titolo medio pari a  $10^{3.49}$ . Gli animali sono stati divisi in cinque gruppi, destinati a ricevere protocolli vaccinali diversi e alloggiati in apposite scatole per la vaccinazione, rispettando la consueta numerosità adottata in incubatoio.

Il gruppo A è stato vaccinato con il ceppo 1/96 (CEVAC® IBird, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 1607E4S2KLB) tramite gel (Cevagel®, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (quantità di gel standard, 25cc/100 pulcini).

Il gruppo B è stato vaccinato con il ceppo B-48 (CEVAC® MASS L, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 0307E2S1KLA) e con il ceppo 1/96 (CEVAC® IBird, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 1607E4S2KLB) in due somministrazioni di gel separate ma consecutive (quantità di gel doppia, 50cc/100 pulcini).

Il gruppo C è stato vaccinato con il ceppo B-48 (CEVAC® MASS L, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 0307E2S1KLA) e con il ceppo 1/96 (CEVAC® IBird, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 1607E4S2KLB) in una singola somministrazione di gel (quantità di gel standard, 25cc/100 pulcini).

Il gruppo D è stato vaccinato con il ceppo B-48 (CEVAC® MASS L, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 0307E2S1KLA) tramite gel (quantità di gel standard, 25cc/100 pulcini).

Il gruppo E ha ricevuto una soluzione *mock* somministrata via spray (25cc/100 pulcino con pressione 1.5 atm) ed è stato utilizzato solamente come gruppo di controllo per la valutazione dell'*intake* vaccinale.

Entrambe le soluzioni, gel e spray, sono state addizionate con il colorante V9030 Sterile Blue Dye (NEL Northeast Laboratory, Waterville, Maine, USA) per evidenziare l'assunzione del vaccino. La vaccinazione spray è stata somministrata con lo strumento DESVAC ELEC KIT (Ceva Desvac Campus, Saint-Barthélemy-d'Anjou, France), mentre quella gel è stata effettuata con la macchina DESVAC GEL DISPENSER (Ceva Desvac Campus, Saint-Barthélemy-d'Anjou, France).

Dopo la vaccinazione i pulcini sono stati lasciati nelle casse, in ambienti separati per evitare contaminazioni, per 30 minuti, in modo da non interferire con l'ingestione del vaccino e le attività di *preening*. A seguire, tutti gli animali sono stati ispezionati sin-

golarmente per valutare la colorazione della lingua come misura dell'avvenuta vaccinazione.

#### *Valutazione clinica*

Ventidue animali per ognuno dei quattro gruppi vaccinati con gel sono stati alloggiati in quattro stanze separate e allevati per 21 giorni, adottando elevate misure di biosicurezza e rispettando le norme relative al benessere animale. I restanti animali sono stati esclusi dal trial. Per ogni gruppo, 12 animali sono stati identificati con un numero progressivo (1-12), per essere esaminati clinicamente e campionati individualmente. Durante i primi 11 giorni, la sintomatologia è stata valutata attribuendo un punteggio, poi aggregato, a segni clinici specifici e di seguito riportato:

0-assenti;

1-scolo nasale chiaro;

2-scolo nasale torbido;

3-tumefazione dei seni infraorbitali e schiuma oculare.

La presenza di rantoli, congiuntivite ed eventuale sintomatologia enterica è stata valutata e registrata. Gli animali sono stati alimentati *ad libitum* e il loro peso è stato monitorato a 5, 10, 14 e 20 giorni.

#### *Campionamento e processazione dei campioni*

Il campionamento è stato effettuato su tutti gli animali mediante tamponi a livello di fessura palatina nei giorni 1, 2, 4, 7, 10, 14, 18 e 21. I tamponi ottenuti dagli animali non marcati sono stati processati in *pool* mentre quelli prelevati dai soggetti 1-10 sono stati gestiti individualmente. Gli animali 11 e 12 sono stati campionati per garantire una numerosità costante, in caso di mortalità tra gli animali marcati. I campioni sono stati processati per l'estrazione dell'RNA virale con il kit commerciale High Pure Viral RNA Kit (Roche, Basel, Switzerland), secondo le istruzioni del produttore.

Ogni campione è stato testato con due differenti Real-time RT-PCR (Tucciarone et al., 2018), validate specificamente per l'identificazione e la quantificazione del ceppo 1/96 e di ceppi Mass-like. Le reazioni sono state eseguite con il kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) utilizzando il termociclatore LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Switzerland).

#### *Analisi statistiche*

La differenza negli score clinici, nei titoli virali e anticorpali tra i gruppi è stata analizzata con i test di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, con correzione di Bonferroni. I dati riguardanti i diversi ceppi vaccinali sono stati analizzati indipendentemente; le medie dei pesi sono state confrontate fra gruppi per momento di misurazione ed eventuali differenze statisticamente significative sono state valutate con i test ANOVA e t-Student con correzione di Bonferroni. Il livello di significatività statistica per ogni analisi è stato fissato a  $p < 0.05$ .

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

La prima ispezione a seguito della vaccinazione ha evidenziato, in tutti i gruppi, la rapida ingestione delle gocce di gel contenenti il vaccino e l'uniformità di copertura degli animali del gruppo E (soluzione *mock spray*). L'esame della colorazione della lingua ha rivelato un contatto con la soluzione vaccinale omogeneo tra i gruppi, con il 98% delle lingue colorate nel gruppo A, 99% nel B, 94% nel C, 100% nel D e 99% nell'E, sottolineando come il gel sia risultato appetibile per i pulcini e quindi rapidamente consumato. In nessun gruppo si è verificata mortalità, né sono stati evidenziati sintomi enterici. La sintomatologia respiratoria si è dimostrata leggermente più mar-

cata nel gruppo A il primo giorno, ma generalmente trascurabile e completamente assente dall'undicesimo giorno di trial fino al termine del trial. Le medie dei pesi corporei sono risultate omogenee tra i gruppi e in linea con gli standard attesi della genetica (Aviagen, 2017). L'insieme di queste valutazioni ha suggerito la sicurezza della somministrazione tramite gel e confermato quella della combinazione dei ceppi vaccinali 1/96 e B-48 (Tucciarone et al., 2018).

Lo studio dei titoli virali dei campioni individuali e *pool* ha permesso di valutare la cinetica dei due ceppi vaccinali. Nei gruppi vaccinati con un solo ceppo, non è stata rilevata alcuna positività all'altro ceppo usato nel trial, indice di assenza di contaminazione tra i gruppi. Il ceppo 1/96 ha raggiunto titoli generalmente più alti del ceppo B-48, con i picchi maggiori intorno al decimo giorno (Fig. 1a). Tutti i *pool* sono risultati positivi, a uno o a entrambi i vaccini a seconda del gruppo, in tutti i punti di campionamento, tranne per il primo prelievo nel gruppo C. Il ceppo 1/96 ha mostrato andamento simile in tutti i gruppi, raggiungendo il valore più alto il giorno 10 nei gruppi A e B e il giorno 14 nel C, con un successivo calo. I titoli del ceppo B-48 invece si sono dimostrati meno omogenei tra i gruppi, con fluttuazioni leggere (Fig. 1a). La cinetica vaccinale si è dimostrata sostanzialmente sovrapponibile a quella ottenuta a seguito di vaccinazione spray, valutata in un precedente studio (Tucciarone et al., 2018).

I campioni individuali hanno invece rivelato il *coverage* vaccinale dei pulcini, sottolineando la presenza del ceppo 1/96 in tutti gli animali a partire dal 4° giorno nel gruppo A e dal 7° nei gruppi B e C, con due sole negatività nel gruppo C a 14 e 18 giorni (Tab. 1). Il ceppo B-48 ha mostrato un comportamento più intermittente (sebbene un solo animale sia risultato negativo in tutti i campionamenti per tutta la durata dello studio) (Tab. 1) e una maggiore variabilità entro lo stesso punto di prelievo (Fig. 1b, 2). Il monitoraggio ripetuto dello stesso animale ha permesso di evidenziare con una curva di Kaplan-Meier, come la probabilità riscontrare il vaccino nel singolo animale raggiunga il 100% già entro il settimo giorno per il ceppo 1/96, mentre per quanto riguarda il ceppo B-48 in alcuni pulcini non si è riscontrata replicazione vaccinale fino all'ultimo giorno. L'utilizzo del medesimo campione per testare la presenza di entrambi i vaccini ha permesso di valutare l'eventuale competizione tra i due ceppi. Sebbene questa ipotesi e il prevalere del ceppo 1/96 possano giustificare questo scenario, l'analogo comportamento di entrambi i vaccini sia somministrati singolarmente sia in associazione permette di escludere questa dinamica. La differenza nei titoli vaccinali può essere quindi imputata a caratteristiche proprie dei ceppi, come un diverso grado di attenuazione, diversa capacità replicativa o tropismo, che possano quindi influenzare la replicazione del ceppo B-48. Uno studio longitudinale di campo più esteso permetterebbe di esplorare l'andamento delle cinetiche vaccinali fino a fine ciclo, per comparare le informazioni raccolte sul ceppo B-48 con quelle riguardanti altri ceppi Mass-like e permetterebbe di valutare un eventuale effetto *rebound* dei titoli del B-48 in corrispondenza con il già identificato calo del 1/96 intorno al 20° giorno (Tucciarone et al., 2018), per esaminare ulteriormente la possibilità di una competizione dei due ceppi.

La relazione tra titoli virali dei campioni individuali e dei *pool* entro lo stesso campionamento ha mostrato come il *pool* di tamponi non restituisca né una somma né una media dei titoli virali dei singoli tamponi, quanto piuttosto rispecchi il titolo più alto tra i singoli campioni (Fig. 2). Questo risultato può essere utile per pianificare il tipo di studio più adatto in funzione delle informazioni che si vogliono ottenere: il

campione individuale si renderà necessario per stimare il *coverage* vaccinale, come conseguenza di una corretta pratica di vaccinazione e il grado di circolazione del vaccino all'interno del gruppo, mentre il *pool*, oltre a restare un efficace ed economico strumento per la rilevazione di ceppi di campo, può fornire indicazioni di massima sulla cinetica vaccinale, soprattutto nell'ambito di uno studio longitudinale.

## CONCLUSIONI

L'utilizzo del gel nella vaccinazione contro il virus della Bronchite infettiva si è rivelato sicuro dal punto di vista clinico, non essendo state riscontrate reazioni avverse di tipo respiratorio o enterico. Inoltre, la cinetica vaccinale si è dimostrata sovrapponibile a quella ottenuta a seguito di vaccinazione spray, con titoli elevati riscontrati nel primo tratto respiratorio a seguito di somministrazione di entrambi i vaccini. Il confronto tra campioni analizzati in singolo e in *pool* ha infine mostrato l'assenza di un effetto cumulativo dei singoli tamponi nel titolo virale complessivo restituito dal *pool*.

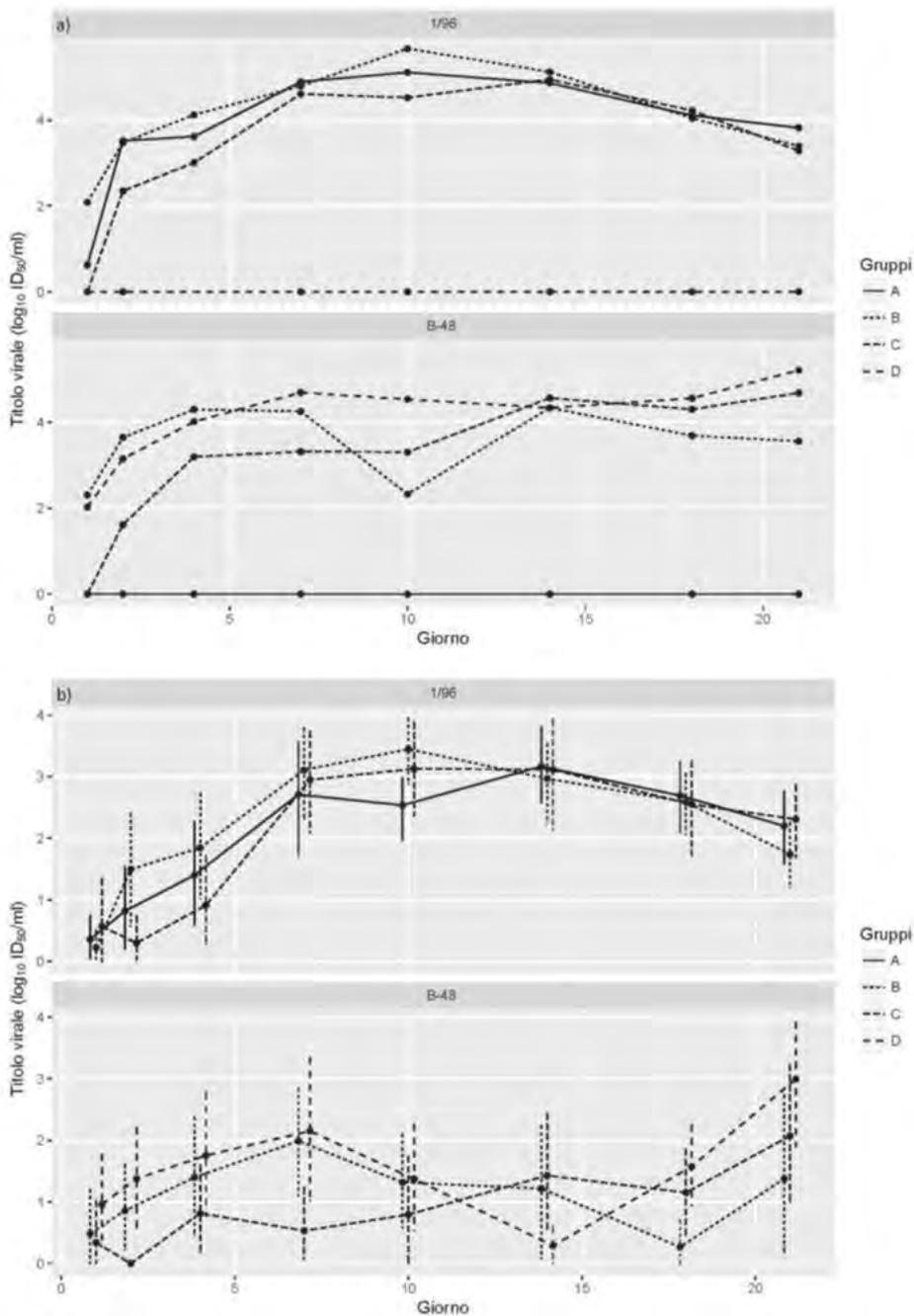
## BIBLIOGRAFIA

1. Aviagen (2017). Ross® 308 AP Broiler Performance Objectives from 2017. Available at [http://la.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Ross\\_Broiler/Ross-308AP-Broiler-PO-2017-EN.pdf](http://la.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-308AP-Broiler-PO-2017-EN.pdf)
2. Al-Attar, M. A., & Lee, E. H. (2011). Gel droplets vaccination method for the delivery of Newcastle Disease Vaccine in the barn. In *Western Poultry Disease Conference* (p. 71).
3. Cavanagh, D., & Gelb, J. (2012). Infectious bronchitis. In *Diseases of poultry* (Vol. Oxford, UK, pp. 117–135).
4. Chapman, H., Cherry, T. E., Danforth, H. D., Richards, G., Shirley, M. W., & Williams, R. B. (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 617–629.
5. Collett, S. R. (2013). Principles of disease prevention, diagnosis, and control introduction. *Diseases of Poultry, Oxford, UK*, 4–60.
6. Cook, J. K. A., 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 Pathology*, 28(5), 477–485.
7. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Blanco, A., Nofrarias, M., Biarnés, M., Cortey, M., ... Cecchinato, M. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine*, 34(46), 5670–5676.
8. Jordan, B. (2017). Vaccination against infectious bronchitis virus: a continuous challenge. *Veterinary Microbiology*.
9. McKinley, E. T., Hilt, D. A., & Jackwood, M. W. (2008). Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine*, 26(10), 1274–1284.
10. Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., ... Cecchinato, M. (2017). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-time RT-PCR quantification. *Poultry Science*.
11. Yegani, M., & Butcher, G. D. (2009). Proper vaccination for healthy flocks. *World Poultry*, 25(7), 1–4.

**Tabella 1:** risultati delle real time RT-PCR specifiche per i ceppi B-48 e 1/96, per gruppo, animale e punto di campionamento.

B-48	Birds	Day								1/96	Birds	Day							
		1	2	4	7	10	14	18	21			1	2	4	7	10	14	18	21
<b>B</b>	1	-	-	-	+	+	+	-	+	<b>B</b>	1	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+	+	+		2	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	+	+	-	-	-	-		3	-	-	+	+	+	+	+	+
	4	-	+	-	+	-	-	+	+		4	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	+	+	-	-		5	-	+	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	-	+	+	-	-	-		6	+	-	+	+	+	+	+	+
	7	-	-	-	+	-	-	-	+		7	-	+	+	+	+	+	+	+
	8	-	-	-	-	-	-	-	-		8	-	-	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	-	-	-		9	-	-	-	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	-	-	-		10	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>C</b>	1	-	-	-	-	+	+	+	+	<b>C</b>	1	-	-	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	-	+	+	+		2	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	+	-	+	+	+	+	+	+		3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	+	-	-	-	-	-		4	-	-	+	+	+	+	+	+
	5	-	-	+	-	-	+	+	+		5	-	-	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	+	-	-	-	-	-		6	-	-	+	+	+	+	+	+
	7	-	-	-	+	-	+	-	-		7	-	+	-	+	+	+	+	+
	8	-	-	+	+	-	+	+	+		8	-	-	-	+	+	+	-	+
	9	-	-	+	+	-	+	+	+		9	-	-	+	+	+	+	+	+
	10	-	-	-	-	+	-	-	-		10	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>D</b>	1	+	+	+	+	+	+	-	+	<b>A</b>	1	-	-	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	+	+	+	+	+		2	-	-	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	+	-	+	+		3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	-	-	-	+	+		4	-	-	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+		5	-	-	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	-	-	-	-	+	+		6	-	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	-	-	+	+		7	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	-	+	-		8	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	-	+	+	+	+	-	+	+		9	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	-	-	+	-	-	-	-	+		10	-	-	+	+	+	+	+	+

**Figura 1:** confronto delle curve delle cinetiche dei due ceppi vaccinali 1/96 e B-48, per gruppo e per singolo punto di campionamento, tra campioni in pool (a) e tamponi individuali (b).



**Figura 2:** confronto dei titoli virali tra campioni in pool e individuali, entro il singolo punto di campionamento.

