

RIDUZIONE DELLA PRESSIONE INFETTIVA DEL VIRUS DELL'ENTERITE EMORRAGICA A SEGUITO DELL'INTRODUZIONE DEL VACCINO VIVO ATTENUATO NELL'ALLEVAMENTO DEL TACCHINO

Lupini C.¹, Mescolini G.¹, Quaglia G.¹, Benedetti V.², Volorio A.², Catelli E.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)*

² *Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Milano*

Abstract

To improve Turkey Haemorrhagic Enteritis virus (THEV) control in turkey production, recently live attenuated vaccination has been temporary introduced in Italy. To monitor vaccine take and field virus circulation, a combined PCR and sequencing protocol for vaccine or field strain differentiation was applied in seven meat turkey flocks. Birds were THEV-vaccinated at four weeks of age with live (5 flocks) or inactivated (2 flocks) vaccines, then sampled by cloacal swabs weekly up to 10 weeks of age. Strains of vaccine origin were detected from 4 to 10 weeks of age in live-vaccinated flocks while field strains were detected from 7 to 10 weeks of age in birds receiving the inactivated vaccine. The observed persistence of the vaccine strain in live-vaccinated flocks can reduce field virus circulation.

INTRODUZIONE

L'enterite emorragica (HE) è una malattia virale del tacchino che colpisce soggetti a partire dalla quarta settimana di vita. In animali sensibili, la patologia è caratterizzata da depressione, morte improvvisa e feci sanguinolente ed è associata ad immunosoppressione. L'importanza economica di questa malattia è dovuta alla mortalità da essa provocata, che può raggiungere anche il 60%, ed alla presenza di una immunodepressione transitoria che può favorire l'insorgenza di altre patologie (Saunders et al., 1993). Studi di campo evidenziano che la malattia si manifesta più frequentemente in soggetti di 7-9 settimane di età (Fadly e Nezerian, 1982). Negli ultimi anni si riscontra principalmente la malattia in forma subclinica associata a mortalità per l'insorgenza di infezioni batteriche secondarie (Giovanardi et al., 2014). L'agente eziologico dell'enterite emorragica è *Turkey siadenovirus A* (genere *Siadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*) virus a DNA lineare a doppio filamento, comunemente denominato *Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus* (THEV). Recentemente per il controllo dell'Enterite Emorragica del tacchino è stato introdotto in Italia, con permesso di importazione temporaneo, un vaccino vivo attenuato ceppo *Domermuth*. Il presente lavoro è nato con l'obiettivo di monitorare la presenza di THEV mediante studi longitudinali in sette gruppi di tacchini vaccinati per THEV a quattro settimane di età con vaccino vivo (5 gruppi) o inattivato (2 gruppi). Tamponi cloacali sono stati eseguiti settimanalmente e processati per la caratterizzazione molecolare dei ceppi virali rilevati.

MATERIALI E METODI

Gruppi oggetto dello studio e campionamento

Sono stati inclusi nello studio 7 gruppi di tacchini da carne, situati in aree ad elevata densità avicola del Nord Italia. Gli animali sono stati oggetto di profilassi vaccinale per

Enterite Emorragica 28 giorni di vita con vaccino vivo attenuato ceppo *Domermuth* (gruppi 1-5) o spento (gruppi 6 e 7). Settimanalmente, da 4 a 10 settimane di età, da 10 animali per gruppo sono stati raccolti tamponi cloacali per la ricerca e la caratterizzazione di THEV mediante PCR e sequenziamento.

Estrazione del DNA virale

I 10 tamponi cloacali di ogni campionamento sono stati processati in pool e risospesi in 1 ml di PBS sterile. Il DNA virale è stato estratto utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) seguendo quanto riportato dal produttore.

Caratterizzazione molecolare di THEV

Per rilevare e caratterizzare THEV nei tamponi cloacali, è stato utilizzato un protocollo che prevede l'amplificazione ed il sequenziamento di due porzioni del genoma virale, sede di marker vaccinali utili per la differenziazione dei ceppi di campo dal ceppo vaccinale (Lupini et al., 2018). Brevemente, i campioni sono stati sottoposti ad una prima PCR che prevede l'amplificazione della regione 3' del gene ORF1 (primer *forward* 5'-CAGGGTAGCGCTTTGTC-3'; primer *reverse* 5'-ACATGCGTTTTT-GTTTTTCTTT-3'); i campioni risultati positivi sono stati ulteriormente amplificati nel gene hexon utilizzando primers riportati in letteratura (Giovanardi et al., 2014). Gli amplificati sono stati purificati utilizzando l'enzima ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (ThermoFisher Scientific) seguendo il protocollo del produttore e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (MacroGen, Madrid, Spain). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate mediante il *software* Bioedit, allineate e confrontate con le sequenze di ceppi THEV precedentemente ottenute, o presenti nel database *GenBank*.

RISULTATI

I risultati della presenza e della caratterizzazione molecolare di THEV nei gruppi oggetto di studio sono riportati nella tabella 1.

Tabella 1. Caratterizzazione molecolare di THEV nei gruppi di tacchini inseriti nello studio.

Età (settimane)	Gruppo						
	1	2	3	4	5	6	7
4	-	-	-	-	-	n.e.	n.e.
5	-	-	-	+vaccino	-	n.e.	n.e.
6	-	-	+vaccino	-	+campo	-	n.e.
7	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+campo	n.e.
8	-	-	-	+vaccino	+vaccino	+campo	+campo
9	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+campo	+campo
10	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+campo	+campo

(-) Negativo a PCR per THEV

(+vaccino) Positivo a PCR per THEV (identità 100% ceppo vaccinale Domermuth)

(+campo) Positivo a PCR per THEV (identità 100% ceppo di campo)

(n.e.) non eseguito

Nei gruppi 1, 2, 3 e 4, vaccinati con vaccino vivo attenuato, sono stati rilevati persistentemente ceppi di origine vaccinale (da 5 a 10 settimane di vita). Tutti ceppi evidenziati mostravano 100% di identità nucleotidica con il ceppo vaccinale *Domermuth* nella regione 3' del gene ORF1 e nel gene hexon.

Nel gruppo 5, anche esso vaccinato con vaccino vivo attenuato, sono stati evidenziati sia un ceppo di campo (a 6 settimane di età) che un ceppi di origine vaccinale (7 a 10 settimane di vita).

Nei gruppi vaccinati con vaccino inattivato (6 e 7) sono stati rilevati ceppi THEV di campo (da 7 a 10 settimane di età).

Tutti i ceppi di campo evidenziati durante lo studio hanno mostrato 100% d'identità nucleotidica con virus circolanti nel nostro paese (Lupini et al., 2018)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stata monitorata la circolazione del virus dell'enterite emorragica del tacchino in gruppi di animali vaccinati con il vaccino vivo attenuato di recente importazione nel nostro paese o con vaccino spento. Come già precedentemente osservato (Giovanardi et al., 2014; Ceruti et al., 2007), nei gruppi vaccinati con vaccino spento THEV, è comune rilevare in maniera persistente durante il ciclo produttivo, la presenza del virus di campo dalla settima settimana di vita in poi. La presente indagine evidenzia come l'introduzione del vaccino vivo è in grado di ridurre o eliminare la circolazione dei ceppi di campo nel periodo considerato.

L'introduzione nel nostro paese del vaccino vivo attenuato può quindi favorire la riduzione della pressione infettiva di THEV nell'allevamento del tacchino, limitando la circolazione di questo agente immunosoppressivo virale.

BIBLIOGRAFIA

1. Beach NM, RB Duncan, CT Larsen, XJ Meng, N Sriranganathan and FW Pierson. (2009) Persistent infection of turkeys with an avirulent strain of turkey hemorrhagic enteritis virus. *Avian Diseases*. 53:370–375.
2. Ceruti R, Della Valentina M, Gavazzi L, Venni A, Ferrazzi V, Grilli G (2007) Haemorrhagic enteritis seroconversion in turkey breeders: field observations. *Ital J Anim Sci* 6:321–325
3. Giovanardi D, Lupini C, Pesente P, Rossi G, Ortali G and E Catelli. (2014) Longitudinal field studies of avian metapneumovirus and turkey hemorrhagic enteritis virus in turkeys suffering from colibacillosis associated mortality. *Veterinary Research Communication*, 38:129–137. 2014.
4. Fadly AM and Nazerian K (1989) Hemorrhagic enteritis of turkeys: influence of maternal antibody and age at exposure. *Avian Dis.*; 33(4):778-86.
5. Lupini C, Mescolini G, Alastra G, Silveria F, Felice V and E Catelli (2018) Enterite emorragica del tacchino: caratterizzazione molecolare di ceppi circolanti in Italia. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2018. III Simposio Scientifico, Parma 14 Settembre 2018. pp. 131-134
6. Saunders GK, Pierson FW, Hurk JV (1993) Haemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: a comparison of virulent and avirulent virus infections, and a proposed pathogenesis. *Avian Pathol.*; 22(1):47-58.