

## VARIAZIONE DEI PARAMETRI IMMUNOLOGICI IN BROILER SPF A SEGUITO DELL'APPLICAZIONE DI DUE DIVERSI PROGRAMMI VACCINALI PER MALATTIA DI GUMBORO

Russo E.<sup>1</sup>, Quaglia G.<sup>2</sup>, Mescolini G.<sup>2</sup>, Salaroli R.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>, Boldini S.<sup>1</sup>, Forni M.<sup>2</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MSD Animal Health, Segrate (MI)

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)

### Summary

Between immunosuppressive chicken viral diseases, Infectious bursal disease (IBD) is one of the most widespread. This disease is primarily controlled through vaccination, as many other diseases like Infectious Bronchitis (IB). In this study the immunological response to IB vaccination was evaluated in groups with different vaccination protocols against IBDV: rHVT-ND-IBD vaccine (group A), immune complex IBD vaccine (group B) and unvaccinated (group C).

In trial n.1, sixty chickens were divided in groups A (n.24), B (n.24) and C (N.12), and day-old vaccinated for IBDV. At 14, 18 and 35 days birds were sacrificed for bursa evaluation. Group B showed a severe bursal atrophy at all sampling points, and a significantly lower bursa-body weight ratio ( $p < 0.05$ ).

In trial n.2, forty chickens (n. 17 in group A, n.17 in B, n.6 in C) were housed in isolators, day old vaccinated for IBDV and, at 14 days vaccinated against IB. At the day of vaccination and at 7, 14, 21 and 28 days post IB vaccination, blood samples for ELISA IB antibody evaluation were collected. The antibody titers against IB were significantly lower in group B than in group A. At 42 days of age (28 days post IB vaccination) birds were all euthanized, and post-mortem evaluation was performed. Harderian gland, spleen and trachea were collected for citofluorimetric evaluation. The groups showed similar relative numbers of CD45+, Bu-1a+ and CD4+ cells, CD8+ cells were more abundant in group B ( $p < 0,05$ ). Similar alterations were already reported for virulent IBDV infected and immunosuppressed birds.

The group vaccinated with the immunocomplex vaccine induced bursal atrophy and immunosuppression highlighted by serology against IB and confirmed by cytofluorimetric alterations.

### INTRODUZIONE

Il virus della Bursite infettiva (IBDV), agente causale della bursite infettiva aviaria (IBD) o malattia di Gumboro, appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. Gli IBDV si suddividono in due sierotipi: al sierotipo 1 appartengono tutti i ceppi patogeni, a loro volta classificati in base a patogenicità e virulenza; al sierotipo 2 appartengono ceppi apatogeni (1).

Tutti i ceppi del sierotipo 1, indipendentemente dalla loro patogenicità, causano dei danni alla Borsa di Fabrizio, e immunosoppressione di grado variabile in funzione del ceppo, della presenza d'immunità materna e dell'età del soggetto infettato; le prime 3 settimane di vita rappresentano il periodo più critico.

L'unico modo di prevenire i danni da IBD è la vaccinazione. I vaccini attualmente

disponibili sul mercato sono di 3 tipi: vivi attenuati, ad immunocomplessi (vaccino vivo attenuato legato a anticorpi specifici per IBDV), vettori virali (Herpes virus del tacchino - HVT) ingegnerizzati in modo tale da esprimere la proteina di superficie VP2 di IBDV (2).

Alcuni vaccini vivi attenuati possono causare lesioni alla Borsa di Fabrizio simili a quelle indotte dal virus di campo (3), con possibili conseguenze negative sull'immunocompetenza degli animali.

La Bronchite Infettiva (IB) è una patologia respiratoria virale altamente contagiosa diffusa a livello mondiale. IB viene controllata principalmente tramite vaccinazione con vaccini vivi attenuati, ma la risposta a questi vaccini può essere compromessa da stati di immunodeficienza dovuti a patologie virali come IB (4).

Lo scopo di questo lavoro è confrontare la risposta immunitaria a vaccinazione per IB di animali vaccinati per IB con un vaccino vettorizzato che esprime proteine di superficie di IBDV e del virus della malattia di Newcastle (rHVT-ND-IBD), o con vaccino ad immunocomplessi (Winterfield 2512 IBV + anti-IBD-antibody).

## **MATERIALI E METODI**

### *Trial 1*

Sessanta pulcini SPF broiler maschi di un giorno sono stati suddivisi in 3 gruppi e vaccinati come segue: A1 (24 animali, vaccinati per IB con rHVT-ND-IBD), B1 (24 animali, vaccinati per IB con vaccino ad immunocomplessi) e C1 (12 animali, gruppo di controllo non vaccinato). Gli animali sono stati accasati, alimentati con mangime *ad libitum* e sacrificati, quindi sottoposti ad esame *post mortem* a 14 giorni (14 animali gruppi A1 e B1, 4 animali gruppo C1), 28 giorni (5 animali gruppi A1 e B1, 4 animali gruppo C1) e 35 giorni (5 animali gruppi A1 e B1, 4 animali gruppo C1). Le borse di Fabrizio sono state valutate macroscopicamente, pesate, e, per ogni animale è stato determinato il rapporto peso della Borsa / peso vivo ( $B:BW = [\text{peso della Borsa di Fabrizio (g)}/\text{peso vivo dell'animale (g)}] \times 1000$ ). Le medie sono state confrontate usando il test di Kruskal-Wallis, e la differenza è stata considerata statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

### *Trial 2*

Quaranta pulcini SPF broiler femmine di un giorno sono stati suddivisi in 3 gruppi e vaccinati come segue: A2 (17 animali, vaccinati per IB con rHVT-ND-IBD), B2 (17 animali, vaccinati per IB con vaccino ad immunocomplessi) e C2 (6 animali, gruppo di controllo non vaccinato). Gli animali sono stati accasati in 7 isolatori, alimentati con mangime *ad libitum* e, al giorno 14 sono stati vaccinati per IB con vaccini vivi attenuati mediante goccia nell'occhio.

Gli animali sono stati sottoposti a prelievi di sangue il giorno della vaccinazione e a 7, 14, 21 e 28 giorni post vaccinazione. I sieri sono stati analizzati per la ricerca di anticorpi nei confronti di IB con kit ELISA commerciale (IDEXX IBV Ab Test-IDEXX, USA). Le medie geometriche dei titoli anticorpali sono state confrontate usando un t-test di Student, e la differenza è stata considerata statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

A 28 giorni gli animali sono stati sacrificati, e sono state campionate la ghiandola di Harder, la milza e la trachea per sottoporle ad esame citofluorimetrico.

L'esame citofluorimetrico è stato impiegato per determinare la quantità di cellule leucocitarie (positive per il marker CD45), e la quantità relativa di cellule che esprimono i marker CD8, CD4 e Bu1a. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard, e per evidenziare eventuali differenze tra i gruppi sono stati impiegati i test statistici One-way ANOVA e Tukey post hoc, le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $p < 0,05$ .

#### Dichiarazione etica

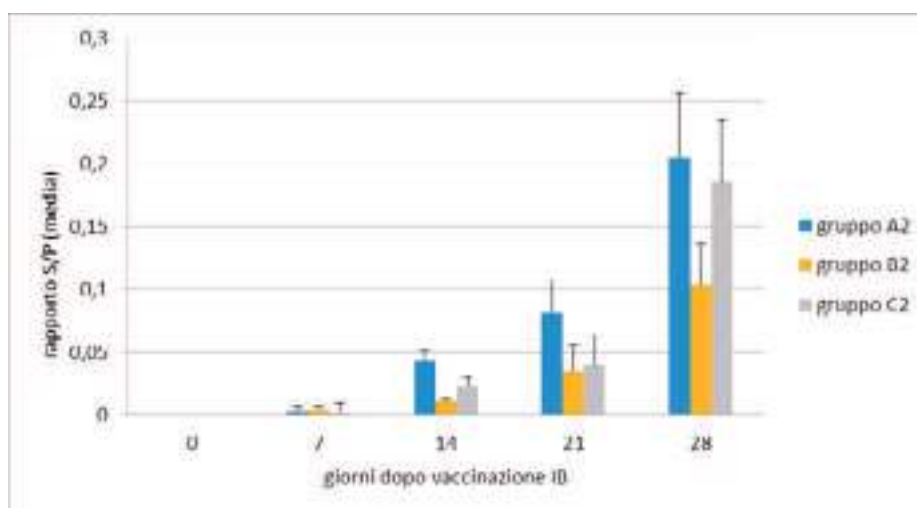
Le due prove sperimentali sono state effettuate in accordo con quanto previsto dalla normativa nazionale sulla sperimentazione animale e sul benessere animale e dopo l'approvazione del piano sperimentale da parte del Ministero della Salute (numero di permesso 478/2016-PR).

### RISULTATI

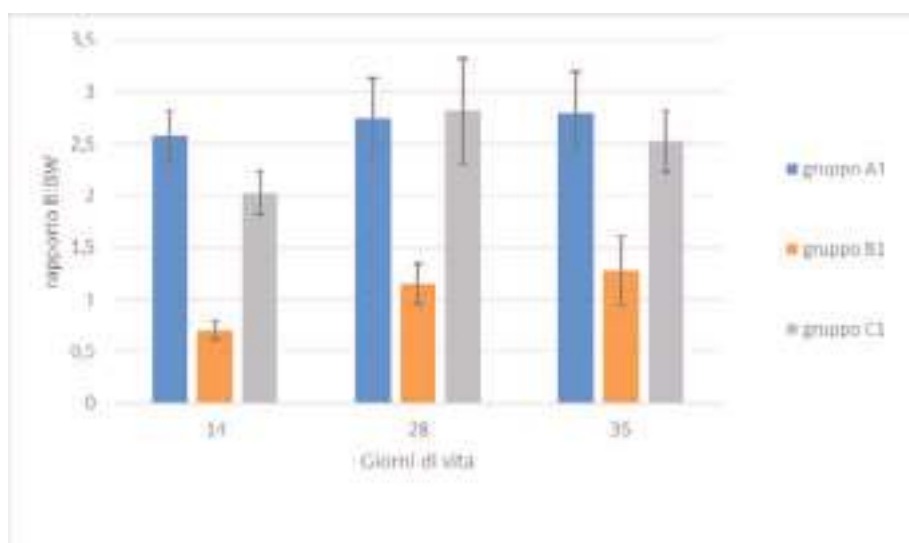
Durante l'esame *post mortem* degli animali appartenenti al trial 1 si è potuta rilevare un'atrofia della Borsa di Fabrizio nel gruppo B1 in tutti i punti di prelievo. Le medie dei rapporti B:BW, per giorno di campionamento sono graficamente riportate nella figura 1. In tutti i punti di prelievo il rapporto B:BW è risultato significativamente più basso ( $p < 0,05$ ) nel gruppo B1 rispetto agli altri gruppi.

I risultati della sierologia del trial 2 sono illustrati in figura 2. Il gruppo A2 ha mostrato titoli anticorpari nettamente più alti di quelli del gruppo B2 ( $p < 0,05$ ) a 14, 21 e 28 giorni post vaccinazione.

L'analisi citofluorimetrica della ghiandola di Harder, della milza e della trachea campionate a 28 giorni post vaccinazione per IB non ha evidenziato nessuna differenza significativa nella quantità di cellule CD45+, Bu1a+ e CD4+ nei tre gruppi, mentre per quanto riguarda le cellule CD8+, il gruppo B presentava valori significativamente più alti degli altri due gruppi ( $p < 0,05$ ) in tutti i tessuti esaminati.



**Figura 1.** Trial 1. Medie dei rapporti B:BW {[peso della Borsa di Fabrizio (g)/peso vivo (g)]  $\times$  1000} a 14, 28 e 35 giorni di vita.



**Figura 2.** Risultati degli esami sierologici per IB a 0, 7, 14, 21 e 28 giorni post vaccinazione (ELISA IBV Ab kit, IDEXX).

### DISCUSSIONE

Il gruppo vaccinato con il vaccino ad immunocomplessi ha presentato una atrofia della Borsa di Fabrizio a 14, 18 e 35 giorni ed una percentuale più alta di cellule CD8+ a 42 giorni di età. Le medesime alterazioni sono già state riportate in animali immunosoppressi a causa di infezioni di campo con ceppi di IBDV virulenti (5, 6). I polli che s'infettano con IBDV precocemente presentano inizialmente un'atrofia della borsa, che poi si ripopola di linfociti B ma ipofunzionali, il risultato è che la percentuale di linfociti B risulta nella norma, ma la capacità di produrre anticorpi è ridotta (7). Durante il presente studio si è riscontrato un risultato analogo nel gruppo vaccinato col vaccino ad immunocomplessi: gli animali così vaccinati hanno infatti mostrato una quantità di cellule Bu1a+ (corrispondenti ai linfociti B) simile agli altri gruppi a 42 giorni di età, ma anticorpi anti IB nettamente inferiori.

### CONCLUSIONI

I risultati di questo studio hanno evidenziato come il vaccino ad immunocomplessi determina una atrofia della Borsa di Fabrizio che causa una ridotta risposta immunitaria alla vaccinazione con vaccino vivo attenuato per IBV, mentre il vaccino rHVT-ND-IBD non causa atrofia della borsa di Fabrizio e non interferisce con l'immunità conferita da vaccino vivo IBV.

### BIBLIOGRAFIA

1. Rosenberger JK and Cloud SS. (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *Abstracts of the 123rd meeting of the American Veterinary Medical Association* (p. 357). July 20–24, 1986, Atlanta, Georgia, USA.

2. Jackwood DJ. (2017). Advances in vaccine research against economically important viral diseases of food animals: Infectious bursal disease virus. *Veterinary Microbiology*. 206:121–125.
3. Killian MP, Boviez JD, Gambarotta M and Lombardo DM. (2017). Induction of apoptosis in the bursa of Fabricius by vaccination against Gumboro disease. *Avian Pathology*. 46(5): 526-534.
4. Toro H, van Santen VL, Li L, Lockaby SB, van Santen E and Hoerr FJ. (2006). Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis, *Avian Pathology*. 35:6, 455-464
5. Kim IJ, Gagic M and Sharma JM. (1999). Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*; 43(3):401-13.
6. Kim IJ, You SK, Kim H, Yeh HY and Sharma JM. (2000). Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*. 74(19): 8884-92.
7. Withers DR, Young JR and Davison TF. (2005). Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression in the chick is associated with the presence of undifferentiated follicles in the recovering bursa. *Viral Immunology*. 18(1): 127-37.