

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI VACCINI INNOVATIVI PRODOTTI IN PIANTA E SVILUPPO DI UNA STRATEGIA DIVA PER LA MALATTIA DI GUMBORO

Bortolami A.¹, Marusic C.², Drissi Touzani C.³, Donini M.², Lico C.², Rage E.², Bonfante F.¹, Zanardello C.⁴, Mazzacan E.¹, El Houadfi M.³, Terregino C.¹, Baschieri S.²

¹ SCS6 - *Virologia Speciale e Sperimentazione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia*

² *Laboratorio Biotecnologie, ENEA Centro Ricerche Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Santa Maria di Galeria RM, Italia*

³ *Unité de Pathologie Aviaire, Département de Pathologie et Santé Publique Vétérinaire, IAV Hassan II, BP 6202, Rabat Instituts, 10000 Rabat, Morocco*

⁴ SCS3 - *Diagnostica specialistica, istopatologia e parassitologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia*

Summary

Infectious bursal disease (IBD) or Gumboro disease is an acute and highly contagious disease affecting young chickens. Gumboro disease is caused by the infectious bursal disease virus (IBDV), a member of the *Birnaviridae* family, genus *Avibirnavirus*, characterized by a bi-segmented double stranded RNA genome enclosed in a non-enveloped capsid. IBDV is endemic in Italy and control of IBD is achieved by vaccination with intermediate and intermediate plus live vaccines and inactivated boosters in breeders. Recently, novel vaccines based on recombinant vectors expressing the protective antigen have been introduced. In our study we evaluated the protective efficacy of a plant-produced subunit vaccine for IBD and developed an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) capable of differentiating vaccinated from infected chickens, thus allowing a differentiating vaccinated from infected animals (DIVA) strategy. Specific pathogen free (SPF) chickens were vaccinated intramuscularly with either purified IBDV-VP2, a commercial inactivated vaccine or phosphate buffered saline (PBS). Immune response was measured with a commercial ELISA kit. Eight days after the last immunization chickens were challenged with a very virulent IBDV strain via the oculo-nasal route. Clinical signs and mortality were recorded daily. Post-mortem examination at the day of death or at the end of the experiment and histopathological examination of harvested bursae of Fabricius was performed. No clinical signs or mortality were observed in the vaccinated groups, while all the sham-vaccinated chickens succumbed to the infection by day 5. Robust seroconversion was observed in the group vaccinated with the plant-produced VP2 antigen, reaching levels comparable to the ones observed in the chickens vaccinated with the commercial vaccine, which resulted in clinical protection as demonstrated by absence of clinical signs and limited bursal depletion. A house-made ELISA based on a different plant-produced IBDV protein was developed and tested with the sera collected during the experimental trial. The ELISA was able to correctly differentiate chickens immunized only with VP2 from animal immunized with the whole virus before the challenge. Further studies are needed to evaluate the ability of the vaccine to overcome maternal immunity and for the DIVA test to identify outbreaks in flocks vaccinated with VP2 based vaccines.

INTRODUZIONE

La malattia di Gumboro o bursite infettiva è una patologia causata da un virus a RNA a doppio filamento (dsRNA) appartenente alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus* (1). L'IBDV è un virus con capsida a simmetria icosaedrica privo di *envelope*. Sono stati identificati due sierotipi di IBDV: il sierotipo 1 comprende ceppi classici, varianti e *very virulent*, mentre nel sierotipo 2 sono compresi esclusivamente ceppi apatogeni. Il virus della bursite infettiva colpisce i linfociti B immaturi presenti nella borsa di Fabrizio. Le conseguenze dell'infezione dipendono dal ceppo responsabile e dall'età dell'animale ma risultano in una immunosoppressione più o meno grave. I ceppi *very virulent* (vvIBDV), isolati inizialmente in Olanda nel 1986 e successivamente diffusi in quasi tutti i continenti, sono caratterizzati da elevata mortalità che può raggiungere il 5%-25% nei broiler e il 30%-70% nelle ovaiole. L'infezione causata dai ceppi *very virulent* causa lesioni pronunciate a carico di muscoli e borsa di Fabrizio associati a una rapida regressione del timo e della borsa a seguito dell'infezione (2). I ceppi vvIBDV sono contraddistinti da specifiche mutazioni nella regione ipervariabile della VP2 in posizione 222 (Ala), 256 (Ile) e 294 (Ile) che sembrano essere associate all'aumento di patogenicità. In Italia studi effettuati negli anni passati hanno mostrato la circolazione di ceppi classici, *very virulent* e più recentemente l'insorgenza di ceppi del genotipo ITA (G6) responsabili di una patologia a decorso subclinico (3) either classical or very virulent, retrieved from GenBank or previously reported in Italy, and from vaccine strains. The new genotype shows peculiar molecular characteristics in key positions of the VP2 hypervariable region, which affect charged or potentially glycosylated amino acids virtually associated with important changes in virus properties. Characterization of 41 IBDV strains detected in Italy between 2013 and 2014 showed that ITA is emergent in densely populated poultry areas of Italy, being 68% of the IBDV detections made during routine diagnostic activity over a two-year period, in spite of the immunity induced by large-scale vaccination. Four very virulent strains (DV86. In Italia la situazione epidemiologica ha portato quindi l'utilizzo diffuso della vaccinazione come mezzo di controllo per prevenire la mortalità e il calo delle performances dovuto all'infezione da IBDV. La maggior parte dei vaccini disponibili attualmente si basa su virus inattivati o vivi attenuati, questi ultimi, a seconda della tipologia, dotati di una virulenza residua più o meno marcata. Vaccini di nuova generazione basati su un vettore ricombinante in grado di esprimere la proteina VP2 dell'IBDV sono stati messi recentemente in commercio. Il capsida del virus è infatti costituito in larga parte da proteine VP2 che assieme alle proteine VP3, presenti in misura minore, costituiscono i principali antigeni verso i quali viene sviluppata una risposta immunitaria a seguito dell'infezione. Gli anticorpi prodotti contro la proteina VP2 sono tuttavia i soli responsabili della neutralizzazione virale.

Lo scopo del presente studio è stato quello di verificare l'efficacia di vaccini innovativi basati sulla VP2 prodotti in piante e di sviluppare una strategia in grado di differenziare animali infetti da animali vaccinati con vaccini basati sulla VP2 (*Differentiating Vaccinated from Infected Animals*, DIVA).

MATERIALI E METODI

Gli antigeni utilizzati nel presente studio sono stati prodotti presso il Laboratorio Biotecnologie dell'ENEA Centro Ricerche Casaccia tramite metodica di trasforma-

zione transiente in piante di *Nicotiana benthamiana*. Le proteine prodotte sono state estratte dai tessuti vegetali omogenati mediante filtrazione e purificazione tramite un cuscinetto di saccarosio. Per valutare l'efficacia protettiva della proteina VP2 prodotta in pianta sono quindi stati utilizzati polli SPF di 8 giorni suddivisi in gruppi di sei animali e immunizzati per via intramuscolare con una preparazione di VP2 risospesa in ISAMONTANIDE 71VG (gruppo VP2), con un vaccino commerciale (gruppo C+) a base di IBVD inattivato (Nobilis®) o con PBS (gruppo C-). Tutti gli animali sono stati vaccinati a 8, 21 e 35 giorni. Otto giorni dopo l'ultima immunizzazione è stato effettuato un challenge con un ceppo di campo di vvIBDV per via oculo-nasale presso gli stabulari dell'Agronomy and Veterinary Institute Hassan II, Rabat, Morocco. Gli animali sono stati monitorati quotidianamente per la presenza di sintomatologia clinica e al termine della sperimentazione (10 giorni p.i.) i polli sono stati soppressi per la valutazione delle lesioni anatomopatologiche e per la raccolta delle borse di Fabrizio successivamente inviate all'IZSVe per esame istologico. Per la valutazione dei titoli anticorpali sono stati utilizzati un kit commerciale (ProFLOCK® infectious bursal disease virus antibody test kit, Synbiotics Corporation, San Diego, USA) ed un test ELISA indiretto sperimentale volto a rilevare la presenza di anticorpi specifici verso una differente proteina virale.

RISULTATI

I polli vaccinati con il preparato di VP2 prodotto in pianta hanno mostrato la produzione di livelli anticorpali simili a quelli osservati nel gruppo di animali vaccinati con il vaccino commerciale. A seguito del challenge con vvIBDV gli animali del gruppo VP2 e C+ non hanno mostrato sintomatologia clinica evidente, mentre nei polli del gruppo C- **è stata osservata sintomatologia clinica riferibile** alle forme sostenute da ceppi vvIBDV che ha portato a morte gli animali entro il quinto giorno post infezione. L'esame anatomopatologico ha mostrato la presenza nei polli del gruppo C- di lesioni tipiche (petecchie a livello muscolare, atrofia di timo e borsa di Fabrizio), mentre negli animali dei due gruppi vaccinati non sono state rilevate alterazioni macroscopiche. L'esame istologico ha confermato le lesioni osservate a livello macroscopico nel gruppo C- con grave deplezione linfocitaria nei follicoli della borsa di Fabrizio e perdita dell'architettura follicolare, mentre negli animali vaccinati sono state osservate alterazioni da assenti a moderate caratterizzate da deplezione linfocitaria ed infiltrazione da parte di macrofagi ed eterofili. Il test ELISA basato su un'altra proteina virale ha consentito di identificare correttamente gli animali vaccinati con virus intero o con VP2 con una specificità del 100% e di verificare la sierconversione negli animali del gruppo VP2 a seguito del challenge.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'IBDV è causa di importanti perdite economiche per il settore avicolo a livello mondiale per la mortalità e l'immunosoppressione conseguenti all'infezione. I vaccini attualmente disponibili presentano diverse problematiche relative alla sicurezza dei ceppi vivi attenuati utilizzati nella pratica comune e talvolta alla protezione parziale offerta nei confronti dei ceppi maggiormente virulenti (4). Per questo motivo negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi vaccini di nuova generazione basati su vettori ricombinanti in grado di indurre immunità protettiva senza produrre lesioni a livello bursale. La produzione di vaccini in pianta offre notevoli vantaggi in ter-

mini di costi di produzione, scalabilità e sicurezza. I risultati ottenuti hanno mostrato come le proteine ricombinanti prodotte utilizzando la piattaforma vegetale siano state in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva comparabile con quella indotta utilizzando vaccini inattivati disponibili in commercio. Studi precedenti effettuati inoculando la forma monomeric della VP2 hanno mostrato solo protezione parziale a seguito di infezione con ceppi classici (5), mentre nel presente studio è stata ottenuta una protezione del 100% a seguito di infezione con ceppi *very virulent*, dimostrando pertanto ottime potenzialità per l'applicazione in campo, come alternativa a basso costo e con maggiori margini di sicurezza rispetto ai vaccini attualmente in commercio. I risultati ottenuti dal test ELISA basato su un'altra proteina virale hanno mostrato un'ottima sensibilità nell'individuare animali vaccinati o infettati con virus di campo. Al momento non vi sono in commercio test sierologici in grado di offrire una strategia DIVA per la bursite infettiva pertanto i risultati ottenuti dal test ELISA messo a punto che permette di differenziare animali immunizzati con la VP2 da animali naturalmente infetti, offrono nuove importanti prospettive per il controllo della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Den Berg TPD. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathol.*
2. Ignjatovic J. 2004. Very virulent infectious bursal disease virus. *Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures.*
3. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M, Catelli E. 2016. A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.*
4. Müller H, Mundt E, Eterradossi N, Islam MR. 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.*
5. Wu H, Singh NK, Locy RD, Scissum-Gunn K, Giambrone JJ. 2004. Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Avian Dis.*