

## **EFFICACIA E SICUREZZA DI UN VACCINO VIVO PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: L'ISTOPATOLOGIA SERVE ANCORA?**

Giudice C.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>, Benedetti V.<sup>3</sup>, Quaglia G.<sup>2</sup>, Mescolini G.<sup>2</sup>, Tecilla M.<sup>1</sup>, Prandini F.<sup>3</sup>, Ortali G.<sup>4</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>, Volorio A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, via dell'Università 6, Lodi;*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia (BO);*

<sup>3</sup> *Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Via Lorenzini 8, Milano;*

<sup>4</sup> *Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi 5, San Michele Extra (VR).*

### **Summary**

Haemorrhagic enteritis (HE) is an economically significant acute gastro-intestinal disorder caused by a group II Adenovirus. A large study was performed under field conditions, to confirm the efficacy of a live attenuated vaccine (Dindoral®) against Haemorrhagic Enteritis Virus (HEV) in turkeys, including virus characterisation (field or vaccine) by detecting and sequencing viral strains, clinical and macroscopic scores of spleen and duodenum, histological lesions of spleen. In the present report only the histopathological results of spleen examination will be reported, in order to discuss the role that histopathology can nowadays play in the study of avian diseases. The study was conducted starting in 2 farms located in North-West Italy, in areas with a high prevalence of HEV, where HEV live attenuated vaccines have never been used before. In each farm, two sheds were chosen and assigned to the control and treated group. The turkeys were monitored from the placement of the animals up to the end of the breeding cycle. A standard vaccination protocol was used at each site, with Dindoral® in drinking water at 28 days of life.

At regular intervals during the study, 5 turkeys per group were necropsied and samples of spleen were collected for histological evaluation and PCR test. Histopathological examination of haematoxylin and eosin microtomic slides obtained from formalin-fixed-paraffin-embedded spleen specimens included a histological description of spleen lesion and the count of spleen follicles present in 5/10x microscopic fields. Histopathological scores were performed in blind and compared with PCR results only at the end of the study.

The HE virus was not found until vaccination with Dindoral® at 28 days of age. Starting from 7 days after the vaccination, the vaccine virus was found in vaccinated groups. The field strain was detected in the unvaccinated groups starting at 35 days of age and sporadically in the vaccinated group from 49 days. The vaccine strain was never detected in unvaccinated animals.

Histological changes (presence of intranuclear inclusion bodies) confirmed the infection by HEV in all groups.

The count of spleen follicles in all groups demonstrated a general decrease in the number of follicles associated to viral infection (vaccine and field strains). The number of follicles remained low in the weeks immediately after viral infection, along with evidence of disease progression (plasmacells and histiocytes infiltration in the

spleen parenchyma). Thereafter, the number of follicles increased up to values consistent with those observed before infection. Interestingly, when compared to vaccinated groups, control groups showed more marked oscillations in the mean number of follicles during the observation period and the follicles' count remained low longer than in vaccinated animals. These results suggested that follicles/lymphocyte B in the spleen, and therefore immunocompetence, was better preserved in the vaccinated group. Histopathological examination when associated to PCR investigation, proved a valuable tool to understand the mechanisms of viral infection and vaccine efficacy.

## **INTRODUZIONE**

L'enterite emorragica (HEV) del tacchino è una patologia sostenuta da Adenovirus (Siadenovirus), e rappresenta una rilevante causa di ritardo di crescita nei giovani soggetti. Il virus della HE (HEV) causa sintomi acuti gastrointestinali ma è anche responsabile di gravi condizioni di immunosoppressione che possono aprire la strada ad infezioni secondarie batteriche (Giovanardi *et al.* 2014) e deprimere la risposta ai vaccini (Nagaraja *et al.*, 1985), con conseguenze imponenti sull'allevamento anche dopo che la patologia virale si è risolta. La condizione di immunocompromissione è indotta primariamente dall'attività linfocitopatica del virus nei confronti dei linfociti B, che ne sono il principale target, ma è stata dimostrata anche l'infezione dei macrofagi. L'immunosoppressione indotta da HEV sarebbe quindi riconducibile all'effetto del virus HEV sui linfociti B e sui macrofagi, con conseguente riduzione della produzione di anticorpi ma anche della fagocitosi macrofagica. Il virus HEV penetra nell'organismo animale per via orofaringea e, attraverso la mucosa intestinale, raggiunge la milza, dove è già riscontrabile al secondo giorno dall'infezione e arriva al picco di replicazione al sesto giorno dall'infezione. Durante questo lasso di tempo si osservano un notevole afflusso di macrofagi nel tessuto splenico (che rendono ragione della splenomegalia osservata macroscopicamente) ed al contempo apoptosi e necrosi dei linfociti B e dei macrofagi stessi. Questa serie di eventi induce lo stato di (transitoria) immunosoppressione.

La vaccinazione dei giovani tacchini ha quindi lo scopo di ridurre le conseguenze dirette ed indirette (immunosoppressione) dell'infezione da HEV. Dal 2018 è stato reso disponibile, con un permesso temporaneo di importazione, un vaccino vivo attenuato (Dindoral® - *Domermuth strain*).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti protettivi del vaccino, in termini di sviluppo della patologia ma anche di conservazione dell'immunocompetenza, attraverso la valutazione istopatologica del parenchima splenico di tacchini esposti alla vaccinazione ed all'infezione di campo. Il lavoro è parte di uno studio molto più ampio che ha considerato anche gli aspetti clinici e biomolecolari dell'infezione da HEV.

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato condotto come trial multicentrico in due allevamenti di tacchini, con sede in aree geografiche ad alta prevalenza di HEV ed in cui la vaccinazione con virus HEV vivo attenuato non era mai stata prima utilizzata. In ogni allevamento è stato individuato un gruppo controllo ed un identico gruppo sottoposto a vaccinazione, stabulati in capannoni non adiacenti. I tacchini sono stati monitorati dall'accasamento fino al termine del ciclo produttivo, il vaccino anti-HEV è stato

somministrato con l'acqua di abbeverata al ventottesimo giorno di vita. La presenza ed il sequenziamento del virus (di campo o vaccinale) sono stati eseguiti con metodica PCR su tamponi cloacali e campioni di milza ad intervalli di 7 giorni per tutto il ciclo (Lupini et al., 2018).

### *Istopatologia*

Per l'esame microscopico del parenchima splenico, ogni settimana (dal giorno 21 al giorno 63 dello studio), in ogni gruppo (vaccinato e controllo) di ciascun allevamento, 5 soggetti sono stati sacrificati ed è stata prelevata metà della milza che è stata immediatamente fissata in formalina tamponata (l'altra metà del parenchima splenico è stata destinata all'indagine PCR).

Da ogni campione fissato in formalina è stata ottenuta una sezione trasversale completa della milza, che è stata quindi routinariamente processata per l'esame istologico ed inclusa in paraffina. Da ogni blocchetto in paraffina sono state ottenute sezioni microtomiche di 5 micron, successivamente colorate con ematossilina eosina e quindi esaminate al microscopio ottico. Per ogni campione sono state descritte le alterazioni morfologiche del parenchima splenico. Inoltre per ogni sezione è stato valutato quantitativamente il numero totale di follicoli (centri germinativi) presenti in 5 campi microscopici a 10X. Per limitare le possibili variazioni inter-individuali, i campi sono sempre stati selezionati nell'area subcapsulare della sezione. Per ogni campionamento è stato quindi valutato il numero medio di follicoli splenici contati nei 5 soggetti sottoposti ad esame. Le valutazioni sono avvenute inizialmente in cieco rispetto ai risultati dell'esame PCR ed alla condizione vaccinale dei soggetti esaminati e solo successivamente confrontate con questi dati.

## **RISULTATI**

Il virus HE non è stato identificato con PCR in nessun soggetto prima della vaccinazione (giorno 28): dal 7° giorno dopo la vaccinazione, il virus vaccinale è stato riscontrato nei gruppi vaccinati mentre non è mai stato reperito nei gruppi controllo. In questi ultimi il virus di campo è stato riscontrato per la prima volta al 35° giorno di età, mentre è comparso sporadicamente nel gruppo vaccinato a partire dal 49 giorno. Istologicamente, a partire dal giorno 35, nei gruppi vaccinati (vaccinazione eseguita il giorno 28) di entrambi gli allevamenti erano evidenti reperti di iperplasia della polpa bianca, dovuta soprattutto ad un massiccio afflusso di cellule istiocitarie, ed occasionalmente associata alla presenza di voluminosi corpi inclusi intranucleari basofili nelle cellule istioidee e linfoidi (compatibili con corpi inclusi da Adenovirus). A partire dal giorno 42 a questa popolazione cellulare si associava un numero considerevole di plasmacellule.

Nei gruppi non vaccinati i primi segni di iperplasia della polpa bianca, con le medesime caratteristiche sopra descritte e la più diffusa evidenza di corpi inclusi intranucleari basofili, era parimenti riscontrabile a partire dal giorno 35 e si associava, talora già nelle prime fasi, a marcata riduzione del volume dei follicoli linfoidi. L'infiltrazione di plasmacellule, nel complesso più contenuta, era evidente un poco più tardivamente, a partire dal giorno 49.

La conta dei follicoli splenici dava risultati variabili tra i soggetti, in accordo con il differente stadio della patologia, era comunque possibile definire un trend generale di variazione del numero totale dei follicoli che subiva una flessione, rispetto ai va-

lori medi osservati nelle prime settimane dello studio, in corrispondenza delle prime fasi dell'infezione. Il numero dei follicoli rimaneva quindi basso nelle settimane immediatamente successive per poi risalire a livelli paragonabili a quelli pre-infezione al termine del periodo di osservazione. Questo trend generale, osservabile in tutti i soggetti esaminati, era caratterizzato tuttavia da una sostanziale differenza tra i gruppi: il gruppo controllo infatti mostrava, rispetto a quello vaccinato, oscillazioni più marcate nel numero medio di follicoli con una più consistente riduzione dopo l'ingresso del virus di campo e un persistere più a lungo di valori di conta bassi.

## **DISCUSSIONE**

L'enterite emorragica (HEV) è una rilevante causa di immunosoppressione nel tacchino, con ricadute sia sul tasso di crescita che sull'esposizione ad altre patologie e sulla capacità di risposta alle vaccinazioni. La vaccinazione anti-HEV si pone quindi l'obiettivo di contrastare gli effetti diretti (mortalità da enterite emorragica) e indiretti (immunodepressione) causati dall'infezione. Parametrare e quantificare l'immunocompetenza dei soggetti, soprattutto in uno studio di campo, non è compito facile. Nel presente lavoro l'indagine istologica del tessuto splenico, organo target della replicazione virale e chiave per il mantenimento dell'immunocompetenza, ha fornito dati rilevanti e contribuito a chiarire l'effetto del virus vaccinale sull'organismo. La conta dei follicoli splenici, quando applicata al gruppo in esame, ha fornito una buona stima della capacità reattiva dell'organismo, consentendo di evidenziare una differente evoluzione delle lesioni nei soggetti vaccinati rispetto a quelli non vaccinati. Essenziale è stato poter contare sui dati di valutazione PCR, che hanno consentito di distinguere con certezza la presenza del virus vaccinale rispetto a quello di campo. L'esame istologico ed in particolare la conta dei follicoli splenici non devono naturalmente essere intesi come una valutazione assoluta sul singolo individuo, ma quando interpretati nel contesto del gruppo ed integrati con dati clinici e molecolari hanno contribuito significativamente a meglio comprendere le dinamiche dell'infezione e della risposta vaccinale.

## **CONCLUSIONI**

In conclusione, la risposta al quesito che ci siamo posti all'inizio dello studio, se l'istologia sia ancora utile nello studio della patologia aviaria, è affermativa: l'esame istopatologico non sostituisce gli altri esami di laboratorio, non è un test rapido, non sempre fornisce risposte sul singolo soggetto ma integra in maniera estremamente importante le informazioni degli altri test diagnostici e contribuisce alla comprensione dei meccanismi eziopatogenetici alla base delle patologie.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Giovanardi D, Lupini C, Pesente P, Rossi G, Ortali G, Catelli E. 2014. Longitudinal field studies of Avian Metapneumovirus and Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus in turkeys suffering from colibacillosis associated mortality. *Vet Res Commun.* 38:129–137.
2. 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
3. Nagaraja KV, Kang SY, Newman JA. 1985. Immunosuppressive effects of virulent strain of hemorrhagic enteritis virus in turkeys vaccinated against Newcastle disease. *Poult Sci.* 64:588–590.
  4. Kuldeep Dhama, Vasudevan Gowthaman, Kumaragurubaran Karthik, Ruchi Tiwari, Swati Sachan, M. Asok Kumar, M. Palanivelu, Yashpal Singh Malik, Raj Kumar Singh, Muhammad Munir 2017. Haemorrhagic enteritis of turkeys – current knowledge, *Veterinary Quarterly*, 37:1, 31-42