

EFFICACIA E SICUREZZA DI UN VACCINO VIVO PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: STUDIO DI CAMPO E ASPETTI MOLECOLARI

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

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia (BO)*

² *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Via dell'Università 6, Lodi (MI)*

³ *Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Via Lorenzini 8, Milano*

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

Summary

To improve Turkey Haemorrhagic Enteritis virus (THEV) control in turkey production, live attenuated vaccination has been temporarily 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 four meat turkey flocks. Birds were THEV-vaccinated at four weeks of age with live vaccine (2 flocks) or not vaccinated (2 flocks), then from day 1 to day 63 of life, five turkeys per group were selected and scored *in vivo* and *at post-mortem*, to assess clinical sign and macroscopic lesions in spleen and duodenum referable to THEV infection; the same birds were sampled by cloacal swabs and spleen collection weekly up to the end of the production cycle for THEV PCR detection and differentiation of field and vaccine strains. Strains of vaccine origin were mainly detected from 4 weeks of age in live-vaccinated flocks up to the end of the production cycle, while field strains were always detected from 5 weeks of age in unvaccinated groups. The cumulative clinical and macroscopic scores were lower in vaccinated animals than in unvaccinated ones. Results showed that persistence of the vaccine strain in live-vaccinated flocks is able to reduce field virus circulation.

INTRODUZIONE

L'enterite emorragica (HE) del tacchino è una malattia virale che colpisce soggetti a partire dalla quarta settimana di vita. 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). Negli ultimi la malattia si è manifestata in forma subclinica, determinando mortalità solo a seguito 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). Dal 2018 per il controllo dell'Enterite Emorragica del tacchino è stato introdotto in alcune regioni del nostro Paese, con permesso di importazione temporaneo, un vaccino vivo attenuato ceppo Domermuth. Il presente lavoro è nato con l'obiettivo di valutare efficacia e sicurezza in campo del suddetto vaccino vivo in gruppi di tacchini vaccinati e non per THEV, mediante score clinico ed anatomo-patologico, rilevazione molecolare del vaccino o del ceppo campo in tamponi cloacali e milze, in corso di studi longitudinali.

MATERIALI E METODI

Piano sperimentale

Sono stati inclusi nello studio 4 gruppi di tacchini da carne, 2 di femmine (gruppi 1 e 3) e 3 di maschi (gruppi 2 e 4). I gruppi 1 e 2 sono stati oggetto di profilassi vaccinale per Enterite Emorragica a 28 giorni di vita mediante somministrazione in acqua da bere del vaccino vivo attenuato ceppo Domermuth; i gruppi 3 e 4 non sono stati vaccinati. Settimanalmente, dal primo al 63° giorno di vita, 5 soggetti per gruppo sono stati selezionati, soppressi e sottoposti ad indagine necroscopica, ad ognuno è stato attribuito uno score clinico ed anatomo-patologico (Tabella 1). A partire dalle 3 settimane di vita sino a fine ciclo produttivo, dagli animali sono stati raccolti tamponi cloacali e milze per la ricerca e la caratterizzazione di THEV mediante PCR e sequenziamento.

Tabella 1. Score clinico ed anatomo-patologico.

Sintomi clinici e lesioni anatomo- patologiche	SCORE		
	0	1	2
Condizioni generali	Buone	Depressione, penne arruffate	Diarrea emorragica, morte
Aspetto macroscopico della Milza	Assenza di lesioni	Aumento di volume	Aspetto marmorizzato
Aspetto macroscopico del Duodeno	Assenza di lesioni	Distensione e congestione della parete	Contenuto emorragico nel lume

Estrazione del DNA virale

I tamponi cloacali sono stati processati in pool o singolarmente. Per l'estrazione in pool i tamponi di ogni campionamento sono stati risospesi in 1 ml di PBS sterile mentre per l'estrazione in singolo ogni tampone è stato risospeso in 0.5 ml di PBS. La processazione delle milze è avvenuta singolarmente, prelevando 25 mg per milza. Il DNA virale è stato estratto utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) seguendo il protocollo del produttore.

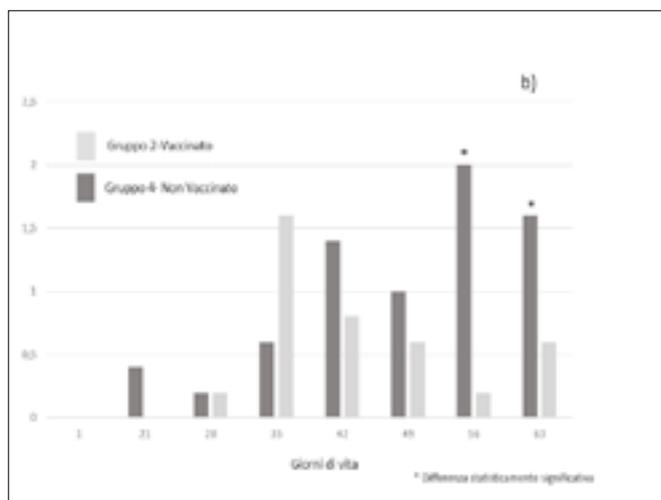
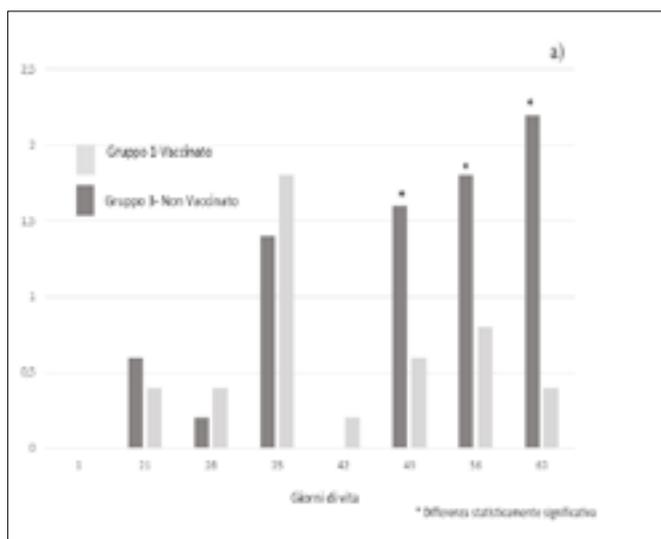
PCR per THEV, sequenziamento ed analisi di sequenza

Per la ricerca e la differenziazione dei ceppi di campo dai ceppi vaccinali di THEV, è stato utilizzato un protocollo che prevede l'amplificazione ed il sequenziamento di una porzione del genoma virale, sede di marker vaccinali (Lupini et al., 2018). Brevemente, i campioni sono stati sottoposti ad una PCR che prevede l'amplificazione della regione 3' del gene ORF1 (primer forward 5'-CAGGGTAGCGCTT-TGTC-3'; primer reverse 5'-ACATGCGTTTTTGTTCCTTT-3'). 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 sequenze di ceppi THEV precedentemente ottenute, del vaccino o con sequenze omologhe presenti nel database GenBank.

RISULTATI

Il punteggio cumulativo dello score clinico ed anatomo-patologico per gruppo è riportato in figura 1. I gruppi non vaccinati (2 e 4) hanno mostrato un punteggio complessivo significativamente più alto ($p < 0.05$) rispetto ai gruppi vaccinati (gruppi 1 e 3) ai giorni di vita 49 (solo gruppo 3), 56 e 63. A 7 giorni post-vaccinazione invece, è stato osservato un punteggio cumulativo maggiore (anche se non statisticamente significativo) nei gruppi vaccinati rispetto ai gruppi non vaccinati, attribuibile nello specifico ad un aumento di volume della milza.

Figura 1. Punteggi cumulativi dello *score* clinico ed anatomopatologico nei gruppi 1 e 3 (a) e 2 e 4 (b).



I risultati degli studi longitudinali sono riportati nella tabella 2. Nei gruppi 1 e 3, vaccinati con vaccino vivo attenuato, sono stati rilevati persistentemente ceppi di origine vaccinale (da 5 a 18 settimane di vita). All'analisi di sequenza tutti i ceppi evidenziati mostravano infatti 100% di identità nucleotidica con il ceppo vaccinale Domermuth nella regione 3' del gene ORF1. In questi gruppi la presenza di ceppi di campo è stata rilevata solo sporadicamente.

Tabella 2. Risultati degli studi longitudinali.

Giorno	GRUPPO 1					GRUPPO 3					GRUPPO 2					GRUPPO 4				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-					-					-					-				
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-					-					-					-				
35	-	C	-	-	-	V	V	V	V	V	-	-	-	-	-	V	-	V	-	V
	-	C	-	-	-	V	V	-	V	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V
42	-	-	-	-	-	V	V	-	V	V	C	-	C	-	-	V	V	V	V	V
	-	-	-	-	-	V	V	-	V	-	C	-	-	-	-	V	V	-	V	V
49	C	C	C	C	C	V	V	V	V	V	C	C	C	C	C	V	V	C	C	V
	C					V					C					V				
56	C	C	C	C	C	V	V	V	V	C	C	C	C	C	C	C	V	V	V	V
	C					V					C					V				
63	C	C	C	C	C	V	V	V	V	C	C	C	C	C	C	V	C	V	V	V
	C					V							C					V		
77	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	C	C	C	C	C	V	V	V	V	V	C	C	C	C	C	V	V	V	V	V
91	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	C					V							C					V		
104	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	C	C	C	C	C	V	V	C	V	V	C	C	C	C	C	-	C	C	V	-
118	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	C	C	C	-	V	V	C	V	V
130	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

M = milza
T = tampone cloacale
- = negativo THEV
C = THEV campo
V = THEV vaccino
/ = campionamento non eseguito

Nei gruppi 2 e 4 non vaccinati sono stati rilevati sempre ceppi THEV di campo, a partire dalle 5 settimane di età a fine ciclo. Tutti i ceppi di campo evidenziati durante lo studio hanno mostrato 100% d'identità nucleotidica con ceppi THEV circolanti già 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, differenziando i ceppi di campo da quelli vaccinali, in gruppi di animali vaccinati o non. La presenza del ceppo di campo si rileva persistentemente nei gruppi non vaccinati, mentre nei gruppi vaccinati, si rileva il ceppo vaccinale nella maggior parte degli animali fino ad almeno 12 settimane post-vaccinazione. I punteggi cumulativi clinici ed anatomico-patologici, hanno mostrato complessivamente valori inferiori negli animali vaccinati rispetto agli animali non vaccinati, indicando un effetto positivo della vaccinazione particolarmente evidente sulla prevenzione delle lesioni anatomico-patologiche da THEV (dati non riportati).

I risultati ottenuti nel presente lavoro suggeriscono che l'introduzione su larga scala nel nostro paese dell'impiego nella profilassi della Enterite emorragica del tacchino del vaccino vivo attenuato ceppo Domermuth possa favorire una riduzione della pressione infettiva di THEV nell'allevamento del tacchino, limitando la circolazione di questo agente immunosoppressivo virale ed il suo impatto sulla salute degli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
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. 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.