

## COMUNICAZIONE 13

### RIDUZIONE DELLA SENSIBILITA' DI TACCHINI VACCINATI ALL'INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS INFLUENZALE H7N3 A BASSA PATOGENICITA'

C. Terregino<sup>1</sup>, G. Cattoli<sup>1</sup>, A. Toffan<sup>1</sup>, M. Mancin<sup>2</sup>, I. Capua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro di Referenza Nazionale ed OIE per la malattia di Newcastle e l'Influenza aviaria – <sup>2</sup>Centro Regionale Epidemiologia Veterinaria del Veneto Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD)

Parole chiave: influenza aviaria, riduzione sensibilità, vaccinazione eterologa

#### Reduced susceptibility of vaccinated turkey to experimental infection with an H7N3 LPAI virus

Key words: avian influenza, susceptibility, heterologous vaccination

Summary: A trial was performed to establish whether turkeys vaccinated against avian influenza with a vaccine containing a strain with a heterologous neuraminidase to the challenge virus, required a higher infectious dose to develop infection than naïve birds. Birds were vaccinated with a commercially available, inactivated oil emulsion product containing the A/ty/Italy/99/H7N1 strain and challenged with different dilutions of a LPAI isolate of the H7N3 subtype (A/ty/Italy/8000/02) obtained during the 2002-2003 Italian epidemic. Groups of 10 vaccinated and 10 unvaccinated birds were experimentally infected with a virus suspension containing  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  EID 50/100 $\mu$ l. Infected birds were observed daily with tracheal and cloacal swabs collected at regular intervals for antigen detection, virus isolation and real-time PCR (RRT-PCR). Pre and post infection serology was also performed. The results of the experiment indicate that infection is achieved in naïve birds with  $10^4$  EID 50, while vaccinated birds are resistant at this challenge dose. Vaccinated and unvaccinated birds were susceptible to infection with  $10^5$ , although the duration and/or the number of birds shedding was reduced in the vaccinated group. The data presented indicate that heterologous vaccination in the framework of a "DIVA" strategy can be a valid tool to support eradication measures in areas with high densities of susceptible animals.

Correspondence: Ilaria Capua, IZS delle Venezie, viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD); email: icapua@izsvenezie.it

#### Introduzione

I virus dell'influenza aviaria (AIV) appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae*, tipo A e possono essere classificati in base alle caratteristiche di patogenicità in virus a bassa patogenicità (LPAI) ed in virus ad alta patogenicità (HPAI). Come per le altre malattie della lista A dell'OIE la vaccinazione per HPAI è vietata nei paesi dell'Unione Europea onde evitare l'interferenza con i piani di siero-sorveglianza ed eradicazione. L'uso di vaccini marker, che permettono di distinguere gli animali infetti dai vaccinati, può rappresentare invece un valido strumento di lotta nel controllo di epidemie da LPAI da affiancare alle misure di biosicurezza (1). Non esistono tuttavia dati che dimostrino se la vaccinazione rende gli animali meno sensibili all'infezione. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di stabilire il livello di sensibilità e l'entità dell'eliminazione virale in tacchini vaccinati con vaccino eterologo e sottoposti a *challenge* con virus LPAI.

#### Materiali e metodi

Animali utilizzati per la prova. 60 tacchine commerciali divise in modo *random* in due gruppi da 30. Un gruppo vaccinato secondo lo schema descritto di seguito ed un gruppo utilizzato come controllo. Ogni gruppo è stato ulteriormente diviso in tre sottogruppi di 10 soggetti ciascuno. Gli animali sono stati allevati a partire dal primo giorno di vita negli isolatori degli stabulari dell'IZS delle Venezie e saggiati con esito negativo alla prova di AGID per la ricerca di anticorpi anti-nucleoproteina prima della vaccinazione.

Vaccino. Vaccino spento in adiuvante oleoso (ceppo A/turkey/Italy/99/H7N1), somministrato secondo il protocollo approvato dalla Commissione Europea (Decisione della Commissione 2002/979/EC). I tacchini sono stati vaccinati ad 8 e 30 giorni di età con 0,25 ml e a 50 giorni con 0,5 ml di vaccino.

Virus di challenge. Virus influenzale, tipo A, sottotipo H7N3 (A/turkey/Italy/02). La EID<sub>50</sub> è stata calcolata con la formula di Reed e Muench in uova SPF.

Protocollo sperimentale. I tre gruppi di animali

vaccinati ed i tre gruppi di animali di controllo sono stati infettati rispettivamente con tre differenti sospensioni virali contenenti  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$  EID<sub>50</sub>/100 $\mu$ l 21 giorni dopo l'ultima vaccinazione. Ciascun animale ha ricevuto 100 $\mu$ l di sospensione virale per via nasale. Gli animali sono stati sottoposti a visita clinica quotidiana. Al giorno 3, 5, 7, 10, 12, 15 e 20 post-infezione (p.i.) sono stati effettuati su ogni animale tamponi tracheali per la ricerca dell'antigene (ELISA), l'isolamento virale e la ricerca del genoma virale (RRT-PCR). Pool di 10 tamponi sono stati stemperati in 1 ml di PBS sterile. Tamponi cloacali sono stati eseguiti al giorno 3, 5, 7, 10, 12, 15 e 20 p.i. per l'isolamento virale e la ricerca del genoma virale (RRT-PCR). Prima del *challenge*, a 71 giorni di vita, i sieri degli animali sono stati testati mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) per valutare il titolo degli anticorpi verso il sottotipo H7.

Test sierologici e virologici. Gli esami sierologici (HI ed AGID) e virologici in uova embrionale di pollo SPF sono stati condotti secondo quanto previsto dalla Direttiva Europea 92/40/EEC.

Ricerca dell'antigene virale. E' stato utilizzato un kit commerciale (Directigen<sup>TM</sup>, Becton Dickinson) per la ricerca dell'antigene da tamponi tracheali.

RRT-PCR. 200  $\mu$ l di sospensione virale in PBS sono stati utilizzati per l'estrazione dell'RNA utilizzando un kit commerciale (High Pure<sup>TM</sup> RNA extraction kit, Roche). 30  $\mu$ l di RNA sono stati retrotrascritti con esameri random in un volume finale di 60  $\mu$ l. Sono stati utilizzati per la PCR *primers* specifici per il gene M di AIV tipo A (4) alla concentrazione di 300 nM, cDNA è stato amplificato in un volume finale di 25  $\mu$ l utilizzando Sybr<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). La PCR è stata effettuata in ABI Prism 7700 SDS. Dopo i cicli di PCR è stata creata una curva di denaturazione al fine di distinguere le amplificazioni specifiche da quelle aspecifiche.

Analisi statistica. I titoli sierologici pre e post-*challenge* sono stati sottoposti ad analisi statistica con il test di Wilcoxon-Mann-Whitney (6) e con il test non

parametrico di Wilcoxon (3).

### Risultati

In nessun animale vaccinato sono stati osservati sintomi riferibili a LPAl. Dei controlli, 5/10 animali infettati con  $10^4$  EID<sub>50</sub>/100 µl hanno mostrato a partire dal 4° giorno p.i. depressione, diarrea e lievi disturbi respiratori. Tre tacchini infettati con  $10^6$  EID<sub>50</sub>/100 µl hanno mostrato anche una sinusite evidenziata da lieve rigonfiamento dei seni infraorbitali. Tutti i sintomi sono scomparsi spontaneamente durante il periodo di osservazione p.i.. I risultati degli esami di laboratorio sono riassunti nelle tabelle 1 e 2. Nessun segno d'infezione è stato evidenziato nei gruppi infettati con  $10^2$  EID<sub>50</sub>/100 µl. I dati relativi agli esami sierologici e allo *shedding* virale dimostrano una infezione attiva nel gruppo non vaccinato infettato con  $10^4$  EID<sub>50</sub>/100 µl. Nel gruppo vaccinato ed infettato con  $10^4$  EID<sub>50</sub>/100 µl non è stata invece osservata sieroconversione o *shedding*. Entrambi i gruppi (vaccinati e controllo) infettati con  $10^6$  EID<sub>50</sub>/100 µl si sono infettati. Tuttavia nel gruppo vaccinato è stata registrata una riduzione della durata dello *shedding* e del numero di animali che eliminano il virus. L'analisi statistica condotta sui dati degli esami sierologici mostra una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) tra il gruppo infettato con  $10^6$  EID<sub>50</sub>/100 µl e gli altri gruppi e tra i titoli dello stesso gruppo rilevati prima e dopo il *challenge* segno di infezione virale attiva. E' stata inoltre osservata una prevedibile discrepanza tra i dati ottenuti con i tre differenti test utilizzati (ELISA, RRT-PCR ed isolamento virale).

### Discussione

Tabella 1. Risultati degli esami sui tamponi tracheali.

Table 1. Results of assays of tracheal swabs

EID <sub>50</sub>	Gruppi	3 gg.	5 gg.	7 gg.	10 gg.	12 gg.	15 gg.	20 gg.
		p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.
RRT-PCR								
$10^2$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
$10^4$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	+	+	neg.
$10^6$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	+	+	+	+	+	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	+	+	neg.
ELISA								
$10^2$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
$10^4$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	+	+	neg.	neg.	neg.
$10^6$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	+	+	neg.	neg.	neg.	neg.
Isolamento virale								
$10^2$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
$10^4$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	neg.	neg.	neg.
$10^6$ EID <sub>50</sub>	Vacc.	+	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	neg.	neg.	neg.

I dati presentati dimostrano che l'infezione sperimentale è stata ottenuta con dosi  $\geq$  a  $10^4$  EID<sub>50</sub>/100 µl negli animali non vaccinati e solo con la dose  $10^6$  EID<sub>50</sub>/100 µl nei soggetti vaccinati. Nel gruppo vaccinato è stata evidenziata con tutti e tre i test utilizzati una riduzione della durata dello *shedding* e del numero di animali che eliminano il virus per via oro-nasale. Un risultato analogo è stato ottenuto dai tamponi cloacali processati per l'isolamento virale ma non confermato dai test in RRT-PCR dai quali emerge una positività fino al 20° giorno p.i.. Considerando l'isolamento virale come "gold standard" l'ELISA appare molto meno sensibile mentre la RRT-PCR più sensibile.

Da questi dati emerge quindi che l'uso della vaccinazione può rappresentare un valido mezzo da affiancare alle misure di eradicazione messe in atto nell'epidemie da AIV. In aggiunta al noto effetto di riduzione dello *shedding* virale (5) si aggiunge pertanto una maggior resistenza all'infezione. La combinazione di questi due effetti può risultare particolarmente utile soprattutto nelle aree densamente popolate. Tuttavia, se il livello di contaminazione ambientale rimane elevato la profilassi vaccinale non riesce ad impedire l'infezione. La vaccinazione può quindi essere considerata solo uno strumento in grado di ottimizzare gli effetti delle misure restrittive e di biosicurezza messe in atto per limitare l'introduzione e la diffusione dell'infezione nelle popolazioni avicole domestiche.

### Bibliografia

1. Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F. & Rodriguez, J.F. (2003). Development of a DIVA-Differentiating infected from vaccinated animals- strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathology*, 32,47-55.
2. CEC. (1992) Council Directive 92/40/EEC of 19 May 1992. *Official Journal of the European Commission*, L 167:1-15.
3. Siegel S. Castellan J. (1992). *Non parametric statistics for the Behavioural Sciences*. Mac Graw- Hill, New York, USA.
4. Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga L.L., Garber, L.P., Perdue, M. L., Lohman, K., Daum, L.T. & Suarez D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR Assay for type A Influenza Virus and the avian H5 and H7 hemagglutin in subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3256-3260.
5. Swayne, D.E. & Suarez, D.L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique et Technique OIE*, 20, 463-482.
6. Thrusfield M. (1995). *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, pp. 267-272.

Tabella 2. Risultati delle prove d'isolamento virale e di RRT-PCR dai tamponi cloacali.

Table 2. Results of virus isolation and viral genome detection (RRT-PCR) assays from cloacal swabs.

EID <sub>50</sub>	Gruppi	Isolamento virale							RRT-PCR							
		3 gg. p.i.	5 gg. p.i.	7 gg. p.i.	10 gg. p.i.	15 gg. p.i.	20 gg. p.i.	Totale campioni positivi	3 gg. p.i.	5 gg. p.i.	7 gg. p.i.	10 gg. p.i.	15 gg. p.i.	20 gg. p.i.	Tot. n.° RNA pos.i	
$10^2$ EID <sub>50</sub>	Vaccinati	0/10*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Non vaccinati	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
$10^4$ EID <sub>50</sub>	Vaccinati	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
	Non vaccinati	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	2/10	3/10	1/10	0/10	0/10	6/60	
$10^6$ EID <sub>50</sub>	Vaccinati	0/10	4/10	4/10	2/10	1/10	0/10	11/60	0/10	3/10	3/10	2/10	3/10	2/10	13/60	
	Non vaccinati	0/10	5/10	6/10	3/10	1/10	0/10	16/60	0/10	5/10	9/10	4/10	2/10	1/10	21/60	

\* N°. di tacchini positivi/n° di tacchini del gruppo (al giorno). \*Number of turkeys positive/number of turkeys in the group (per day)