

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ANTICORPALE DI POLLI DA CARNE INFETTATI SPERIMENTALMENTE CON *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* NETB-POSITIVO

Bano L.¹, Tonon E.¹, Berto G.¹, Drigo I.¹, De Zan G.¹, Bonfante F.², Terregino C.², Cattoli G.², Vascellari M.³, Mazzolini E.⁴, Agnoletti F.¹

¹ Sezione Diagnostica di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba, Treviso

² Laboratorio di Virologia Speciale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro

³ Laboratorio di Istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro

⁴ Dipartimento di Epidemiologia Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Pozzuolo 330, 33100 Udine

Summary

Recombinant NetB toxin (rNetB) and the dialyzed product of a *C. perfringens* NetB-positive strain (dNetB+) were used as antigens of two direct enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The developed serological tests were used to study the humoral response of chickens that experienced necrotic enteritis induced by oral administration of a NetB-positive *C. perfringens* culture. Sera of orally infected chickens were collected before infection and up to the 4th week after infection. Chickens subcutaneously immunized with rNetB, dNetB+ and the dialyzed product of a *C. perfringens* NetB-negative culture (dNetB-), were included in the study. There was no difference in the antibody amounts of orally infected chickens and the non-infected group (control). The ELISA with rNetB was able to discriminate chickens immunized with dNetB- better than did the one set up with dNetB+. The experimental protocol used to induce NE was successful and produced both gross and histological relevant lesions. Based on our results, experimentally induced necrotic enteritis was incapable to stimulate a humoral immunity detectable with our ELISAs. However, dNetB+ -based ELISA represents a promising tool to study antibody dynamics in naturally exposed subjects and parenteral immunized chickens.

INTRODUZIONE

La tossina NetB prodotta da *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) è considerata il principale fattore di virulenza implicato nella patogenesi dell'enterite necrotica del pollo. E' una "pore forming toxin" di 33 kDa in grado di ledere in modo irreversibile la membrana citoplasmatica della cellula dell'ospite causandone la morte (Keyburn *et al.*, 2008). La somministrazione sottocutanea di tossina NetB ricombinante (rNetB) si è dimostrata in grado di generare IgY specifiche evidenziabili attraverso metodi immunoenzimatici (Keyburn *et al.*, 2013), in letteratura, tuttavia, non risultano studi sulla risposta anticorpale di animali che abbiano sperimentato la malattia in condizioni di campo o infettati sperimentalmente per via orale.

Scopo della presente ricerca era quello di sviluppare un test sierologico in grado di

rilevare anticorpi prodotti nei confronti di *C. perfringens* e della sua tossina NetB per migliorare le conoscenze sulla risposta anticorpale in modelli sperimentali. I risultati riportati nel presente lavoro sono stati ottenuti nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 09/11 "Sviluppo di un kit ELISA per la valutazione della risposta anticorpale a tossine prodotte da *C. perfringens* e *C. septicum* nel pollo", finanziata dal Ministero della Salute.

MATERIALI E METODI

Produzione dell'antigene

Per l'allestimento del test immunoenzimatico (ELISA) sono stati utilizzati come antigeni sia la tossina NetB ricombinante (rNetB) che il prodotto di una coltura dializzata di *C. perfringens* NetB+ (dNetB+).

La rNetB è stata prodotta secondo quanto riportato in letteratura (Keyburn *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2012). La produzione della tossina è stata verificata mediante western blotting utilizzando un siero specifico anti-NetB prodotto su coniglio e gentilmente fornito dal Dr. R. Moore (CSIRO Biosecurity Flagship, Australian Animal Health Laboratory).

L'antigene prodotto in coltura dializzata, e i sieri di controllo con questo ottenuti, sono stati cortesemente forniti dal Dr. A. Ferrarese (Sezione Diagnostica di Vicenza, IZS delle Venezie). L'antigene dializzato è stato prodotto coltivando un ceppo di *C. perfringens* NetB-positivo all'interno di un sacco da dialisi con porosità compresa tra 10 e 20 kDa, immerso in terreno TPG (Lesley *et al.*, 1989), con L-cisteina (0,1%) in sostituzione del tioglicolato. L'apparato da dialisi così costituito è stato successivamente incubato a 37 °C per 18 ore. Al termine dell'incubazione il contenuto del sacco veniva raccolto, centrifugato a 6100 x 30 minuti ed il soprannatante trasferito in altro sacco da dialisi e lavato immergendolo per 48 ore in soluzione fisiologica. Un secondo antigene è stato prodotto in coltura dializzata come sopra esposto, ma impiegando un ceppo NetB negativo (dNetB-).

Sieri di controllo

La rNetB è stata utilizzata per effettuare una doppia immunizzazione a 2 polli per via sottocutanea a distanza di 10 giorni, impiegando una combinazione di adiuvanti suggerita in letteratura (Keyburn *et al.*, 2013). Gli antigeni dNetB+ e dNetB- sono stati adiuvati in idrossido di alluminio e somministrati ciascuno a 3 polli per 3 volte a distanza di 3 settimane per via parenterale.

Come controllo negativo è stato utilizzato il siero di un pollo SPF di 2 mesi d'età.

Riproduzione della malattia

La sperimentazione di seguito descritta è stata condotta in ottemperanza a quanto previsto dal D. L.vo 116/92 e successive modificazioni e integrazioni, previo parere favorevole del comitato etico dell'IZS delle Venezie.

Per la riproduzione della malattia sono stati impiegati 78 polli bianchi forniti da incubatoio commerciale e accasati all'età di 1 giorno. Il primo giorno di vita 26 soggetti sono stati salassati e i pacchetti intestinali sottoposti alla ricerca di *C. perfringens* attraverso tecniche di biologia molecolare quali-quantitative (Wu *et al.*, 2011). I

restanti pulcini sono stati suddivisi in 2 gruppi di 26 soggetti ciascuno e stabulati in box. L'alimentazione *ad libitum* era assicurata da mangiatoie a campana mentre l'acqua di bevanda era somministrata tramite abbeveratoi a goccia. Il 7° giorno i soggetti di entrambi i gruppi sono stati singolarmente identificati mediante apposizione di anello numerato su un arto inferiore. Il gruppo "controllo" è stato alimentato con mangime commerciale mentre al gruppo "trattato" sono stati somministrati consecutivamente 3 tipi diversi di mangime denominati "starter" (da 1 a 8 gg), "grower" (9-16) e "finisher" (17-49). La fonte di cereale contenuta in tutti i 3 tipi di mangime era costituita da frumento (43%) e riso (7,5%) mentre quella proteica proveniva da farina d'estrazione di soia (25%) per i mangimi "starter" e "grower" e da farina di aringhe (30%) per il "finisher". Il mangime "grower" si differenziava dallo "starter" per una maggiore concentrazione lipidica.

L'infezione sperimentale del gruppo "trattato" è stata eseguita utilizzando il ceppo "CP 56" (tipo A, NetB-positivo), cortesemente fornito dal Prof. F. Van Immerseel dell'Università di Gent (Belgio).

A partire dal 18° giorno di vita e per 4 giorni consecutivi, il gruppo sperimentale è stato infettato per via orale con 1 mL di una sospensione batterica contenente 1×10^8 UFC/mL di *C. perfringens*, somministrata per 3 volte al giorno a distanza di 4 ore. Il 19° giorno di vita, i soggetti del gruppo sperimentale sono stati singolarmente vaccinati per coccidiosi per via orale (Paracox-5^{MT}, MSD), secondo la posologia indicata nel foglietto illustrativo del prodotto.

Accertamenti diagnostici

Il giorno dell'arrivo e settimanalmente sino al 49° giorno d'età, sono stati eseguiti prelievi di sangue da soggetti di entrambi i gruppi ("trattato" e "controllo"). In concomitanza con il prelievo ematico sono state valutate le condizioni cliniche degli animali e i pesi di ciascun soggetto. Alcuni mesi dopo tale prova, sono stati accasati nuovamente 26 pulcini provenienti dallo stesso incubatoio e alimentati solo con i mangimi sperimentali utilizzati nella precedente prova per il gruppo "trattato", per verificare se le eventuali differenze ponderali del gruppo fossero da attribuire al mangime o alla malattia. L'accrescimento ponderale è stato valutato sino al 42° giorno di vita e le differenze tra i gruppi studiate attraverso il test dell'analisi della varianza (ANOVA). Per verificare l'induzione della malattia nel gruppo "trattato", il 27° giorno d'età, 10 soggetti di ogni gruppo sono stati sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico. Le lesioni a carico dell'intestino sono state classificate con uno score compreso tra 1 e 6, secondo quanto proposto da Shojadoost e coll. (2012). Durante l'esame necroscopico sono stati inoltre prelevate porzioni intestinali in corrispondenza del diverticolo di Meckel di tutti i soggetti e da tratti con lesioni macroscopiche evidenti o dubbie, da sottoporre ad esame istopatologico. Alle lesioni istologiche è stato assegnato uno score sulla base della gravità delle stesse, così definito: score "0" = assenti lesioni; score "1" = diffusa e lieve enterite erosiva associata ad infiltrazione linfoplasmocitaria e di più rari eterofili della lamina propria; score "2" = diffusa enterite necrotico-erosiva linfoplasmocitaria di grado moderato; score "3" = diffusa grave enterite necrotica che interessa i 2/3 superficiali della mucosa con rari focolai ulcerativi e moderata infiltrazione linfoplasmocitaria diffusa.

Un grammo di contenuto intestinale raccolto in pool da vari tratti di ciascun soggetti sacrificato, è stato sottoposto a ricerca di *C. perfringens* sia attraverso tecniche di batteriologia classica che mediante real-time PCR (Wu *et al.*, 2011). La ricerca microbiologica di *C. perfringens* è stata eseguita previo arricchimento del campione in brodo Cooked Meat Medium (CMM). Dopo 48 ore d'incubazione a 37 °C in condizioni d'anaerobiosi, i CMM sono stati seminati su terreno agarizzato Perfringens Agar Base, a sua volta incubato a 37 °C in anaerobiosi (Oxoid). Dopo 24-48 ore le colonie sospette sono state isolate e identificate mediante MALDI TOF (MALDI LT Biotyper, Bruker Daltonics) e i ceppi di *C. perfringens* sono stati successivamente sottoposti alla ricerca del gene codificante la tossina NetB mediante PCR (Keyburn *et al.*, 2008). In tutti i soggetti è stato eseguito un esame parassitologico tramite osservazione microscopica diretta del raschiato intestinale, raccolto sia da intestino tenue che da cieco.

Allestimento del test ELISA

Per la messa a punto del metodo sono state effettuate varie prove valutando l'ottimale concentrazione di antigene, anticorpo primario e coniugato.

Piastre Maxisorp NUNC-immunoplate sono state coattate con 0,5 µg /pozzetto di rNetB, diluita in tampone carbonato (pH 9.6), e incubate per 1,5 ore a 37 °C. E' seguito il lavaggio con PBS contenente 0,05 % di Tween-20 (PBS-T) per 3 volte e blocco dei siti aspecifici con BSA al 6% per 1 ora a 37°C. Successivamente si è proceduto al lavaggio con PBS-T (3 volte) e all'incubazione per 1 ora a 37 °C con 100 µL/pozzetto dei sieri di pollo diluiti 1:100. Le piastre sono state poi nuovamente sottoposte a triplice lavaggio con PBS-T e quindi incubate con 100 µL/pozzetto di una soluzione 1:5000 di anticorpi anti-IgY di pollo, coniugati con perossidasi (Sigma). La piastra è stata quindi nuovamente incubata per 1 ora a 37 °C e successivamente lavata come precedentemente descritto. La presenza di legame specifico è stata poi rilevata aggiungendo a ciascun pozzetto 100 µL di substrato (ABTS peroxidase substrate system, KPL). La lettura spettrofotometrica è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 405 nm (SunRise, TECAN).

Il medesimo test è stato allestito impiegando il prodotto della coltura dializzata del ceppo di *C. perfringens* dNetB+ diluito 1/40.

I risultati del test ELISA ottenuti dai soggetti dei gruppi “trattato” e “controllo” sono stati normalizzati applicando la formula (OD campione – OD controllo neg)/ OD controllo positivo.

RISULTATI

I pulcini di entrambi i gruppi sono risultati negativi per *C. perfringens* all'arrivo e la valutazione clinica settimanale degli animali eseguita sino al 18° giorno d'età non ha permesso di evidenziare alcun sintomo di malattia. Il 4° giorno post-infezione, 14/26 soggetti del gruppo “trattato” presentavano imbrattamento fecale della regione pericloacale da “moderato” a “grave”.

Dopo 6 settimane, i soggetti del gruppo “infetto” pesavano mediamente 317 gr/capo in meno rispetto al gruppo alimentato con il mangime commerciale e 112 gr/capo in meno rispetto al gruppo alimentato con lo stesso mangime sperimentale (figura 2).

La differenza fra le medie dei pesi raggiunti alla sesta settimana di vita dal gruppo “trattato” e quelle degli altri 2 gruppi è risultata statisticamente significativa ($P=0,05$). Gli score (LS) assegnati alle lesioni osservate all’esame anatomopatologico e istologico si sono dimostrati significativamente più elevati nel gruppo “trattato” rispetto al gruppo “controllo” (tabella 1). 8/10 soggetti del gruppo “trattato” e 1/10 del gruppo “controllo” sono risultati positivi per *C. perfringens* tramite real-time PCR a concentrazioni comprese tra $1,3 \times 10^2$ e 3×10^4 UFC/g. Tra questi, *C. perfringens* NetB-positivo è stato isolato da 2 soggetti del gruppo “trattato” e *C. perfringens* NetB-negativo da 1 soggetto del gruppo “controllo”. Negli altri soggetti non è stata rilevata la presenza di *C. perfringens* né tramite esame batteriologico né attraverso real-time PCR. L’esame parassitologico ha dato esito costantemente negativo.

L’ELISA allestito con la tossina rNetB ha permesso di evidenziare buoni titoli anticorpali sia nei soggetti immunizzati per via parenterale con rNetB (OD media = 3.313) che in quelli immunizzati con dNetB+ (OD media = 2.196). Nei soggetti immunizzati con dNetB- la risposta si è attestata su valori decisamente inferiori (OD media = 0.702), ma comunque superiori rispetto al controllo negativo (OD = 0.205). Risultati simili si sono ottenuti anche impiegando il test ELISA allestito con dNetB+, sebbene non si sia dimostrato in grado di discriminare animali immunizzati con dNetB-.

I titoli rilevati nel gruppo infettato sperimentalmente per via orale e nel gruppo “controllo” sono risultati pressoché sovrapponibili, sia con l’ELISA allestito con rNetB che con quello allestito con dNetB+ (figura 1).

DISCUSSIONE

Il protocollo utilizzato per la riproduzione sperimentale della malattia si è rivelato efficace, come dimostrato dalla gravità delle lesioni macroscopiche ed istologiche osservate nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo. La registrazione dei pesi dei polli a 42 giorni di vita evidenzia chiaramente la penalizzazione delle performance zootecniche degli animali causata dall’enterite necrotica, a parità di alimentazione e di condizioni d’allevamento.

Non è stato possibile rilevare una differenza tra i titoli anticorpali del gruppo “trattato” e di quello “controllo” ed entrambi hanno mostrato un andamento anticorpale sovrapponibile. In particolare si è osservato che i pulcini all’arrivano possedevano già titoli anticorpali elevati, probabilmente di origine materna, che sono diminuiti all’inizio della seconda settimana per poi mantenersi costanti fino alla quarta. Dalla quarta settimana i titoli sono aumentati in modo pressoché costante sino al termine della sperimentazione (figura 1). L’innalzamento del titolo anticorpale dopo la quarta settimana può essere spiegato attraverso il contatto con ceppi di campo di *C. perfringens*, anche nel gruppo “controllo”, come evidenziato dalla positività all’esame culturale.

CONCLUSIONI

La riproduzione della malattia attraverso infezione sperimentale per via orale si è dimostrata inadeguata a conferire un titolo anticorpale differenziabile rispetto a quello del gruppo “controllo”. Il test ELISA messo a punto è risultato però in grado di discriminare animali immunizzati per via parenterale. Il test non trova pertanto

applicazioni nello svelare la circolazione di ceppi di *C. perfringens* NetB-positivi in gruppi di broiler, ma potrebbe essere impiegato per valutare la risposta anticorpale in soggetti immunizzati per via parenterale o per studiare la dinamica anticorpale in gruppi di animali che entrino in contatto con il patogeno in condizioni di campo. Dato che la vaccinazione per via parenterale risulta operativamente praticabile solo in gruppi di riproduttori, il titolo anticorpale rilevato nella progenie al primo giorno di vita potrebbe essere utilizzato per studiare quanto questo possa influenzare le prestazioni produttive del gruppo.

BIBLIOGRAFIA

1. Keyburn, L., Boyce, J.D, Vaz, P., Bannam., T. L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J. I, Moore, R. J. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: 0001-0011.
2. Keyburn, A. L., Portela, R. W., FordM. E., Bannam T. L., Yan X. X., Rood J. I., Moore R. J. 2013. Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis. *Veterinary Research*, 44:108.
3. Leslie D., Fairweather N., Pickard D., Dougan G., Kehoe M. 1989. Phospholipase C and haemolytic activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin cloned in *Escherichia coli*: sequence and homology with a *Bacillus cereus* phospholipase C. *Molecular Microbiology*, 3(3), 383-392.
4. Shojadoost B., Vince A. R., Prescott J. F. 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Veterinary Research*, 43:74.
5. Wu S. B., Rodgers N., Choct M. 2011. Real-Time PCR Assay for *Clostridium perfringens* in broiler chickens in a challenge model of necrotic enteritis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:1135–1139.

Tabella 1. “Lesion score” (LS) attribuiti alle lesioni anatomo-patologiche (LS da 1 a 6) o istopatologiche (LS da 1 a 3) nei 10 soggetti del gruppo “trattato” ed in quelli del gruppo “controllo” sacrificati 10 giorni dopo l’inizio dell’infezione sperimentale.

n°	Lesioni anatomo-patologiche		Lesioni istologiche	
	Controllo	Trattato	Controllo	Trattato
1	0	4	0	3
2	0	4	0	2
3	0	4	1	2
4	0	3	1	2
5	1	4	2	2
6	0	1	1	1
7	0	4	1	3
8	1	5	1	3
9	0	0	1	1
10	3	5	2	3

Figura 1. Andamento delle medie dei titoli anticorpali verso l'antigene dNetB+ nei 2 gruppi sperimentali. L'infezione sperimentale del gruppo "treated" è cominciata il 18° giorno di vita ed è terminata il 22°.

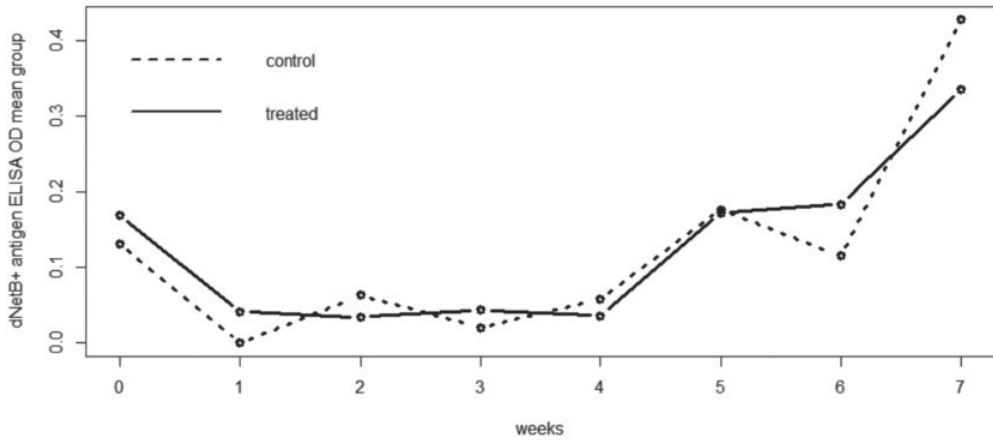


Figura 2. Incremento ponderale dei gruppi sperimentali, rilevato sino alla sesta settimana. Control 1: gruppo alimentato con mangime commerciale; Control 2: gruppo alimentato con il mangime sperimentale; Treated: gruppo alimentato con il mangime sperimentale e sottoposto a infezione sperimentale con *C. perfringens* NetB+.

