

## **STRATEGIA DI DIFFERENZIAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DA CEPPI DI CAMPO DEL VIRUS DELL'INFLUENZA (SOTTOGRUPPO H5) E DA VACCINI RICOMBINANTI**

Lesceu S., Gaimard M., Redal C., Drus J-E., Lefebvre C., Pourquier P.

*Innovative Diagnostics, 310 Rue Louis Pasteur, 34790 Grabels, Francia*

### **Summary**

The Influenza A virus is at the origin of infections in both humans and animals and can lead to more or less serious forms depending on the strain. In order to control outbreaks and avoid massive culling as well as significant economic losses for farmers, vaccination of the flocks is becoming more and more essential given the epidemiology of H5 HPAI worldwide.

Vaccination with recombinant vaccines is increasingly developed. That is why IDvet has chosen to develop tools able to differentiate the antibodies developed after an infection by a field strain from the antibodies elicited by vaccination of the animals.

### **INTRODUZIONE**

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia degli *Orthomyxoviridae* e infettano sia l'uomo che una varietà di ospiti animali. Esistono quattro tipi di virus influenzali: A, B, C e D, definiti dalla natura dell'antigene del nucleocapside interno. Il tipo A è quello più conservato e può essere ulteriormente suddiviso in sottotipi in base agli antigeni emoagglutinina (H) e neuraminidasi (N). Sono stati isolati diciotto antigeni H (da H1 a H18) e undici antigeni N (da N1 a N11). La maggior parte dei virus dell'influenza aviaria (sottotipi da H1 a H18) sono a bassa patogenicità, come l'H9, e sono generalmente coinvolti in coinfezioni con altri virus aviari, che possono portare a importanti perdite negli allevamenti di pollame. Alcuni sottotipi contenenti H5 e H7 sono associati a forme altamente patogene della malattia, con un alto tasso di mortalità.

La vaccinazione è uno strumento essenziale per il controllo delle malattie del pollame e per molti anni sono stati utilizzati vaccini convenzionali. Oggi, le innovazioni nella vaccinologia avicola includono vaccini immunocomplessi e vaccini vettoriali. I vantaggi associati a questi ultimi includono la biosicurezza, l'efficienza, la capacità di creare un'immunità passiva e l'immunità di lunga durata. Negli ultimi 5 anni, le ondate successive di influenza in Europa hanno spinto le autorità sanitarie a rivedere la loro strategia di vaccinazione contro questo virus, e oggi, in particolare, contro il virus H5 in Europa. Attualmente è necessario sviluppare il vaccino anti-influenzale ideale per affrontare questa malattia. Diversi studi hanno dimostrato l'efficacia di vaccini vettoriali contro l'IA con l'inserimento dell'emoagglutinina (HA) H5 [2], [3], H7 [4] e H9 [5] in un vettore HVT.

Poiché attualmente esistono alcuni vaccini candidati H5, IDvet ha sviluppato un nuovo test ELISA, l'**ID Screen® Influenza H5 Indirect**, basato sulla proteina H5. Questo kit è uno strumento eccellente per il monitoraggio dei vaccini convenzionali e ricombinanti e anche per l'implementazione di strategie DIVA: gli animali

vaccinati possono essere monitorati con questo nuovo kit e gli animali naturalmente infetti possono essere individuati con l'**ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect**.

## **MATERIALI E METODI**

### *Studio della specificità del kit FLUH5S*

L'esclusività è stata studiata utilizzando 2 diversi pannelli influenzali:

- Uno proveniente da GD Deventer: sono stati analizzati 2 diversi ceppi H5 (H5N2 e H5N3) e i sottotipi H6, H7 e H9.
- Un secondo proveniente dal Friedrich-Loeffler-Institut (FLI). Sono stati analizzati i seguenti ceppi: H2N5, H2N9, H3N1, H5N2, H5N3, H6N2, H7N1, H7N7, H10N4 e H11N6.

In secondo luogo, per determinare la specificità diagnostica del test FLUH5S ELISA, sono stati analizzati 320 sieri di volatili SPF (origine: Francia) e 100 sieri di polli da carne esenti da malattia (origine: Ungheria).

### *Monitoraggio dei volatili vaccinati con Vectormune AI (rHVT-AI(H5))*

Le galline ovaiole sono state vaccinate con il vaccino ricombinante Vectormune AI rHVT-H5 (da Ceva Santé Animale) a un giorno di età e in seguito inoculate a 55 settimane di età con il ceppo H5N8 del virus influenzale. I titoli anticorpali sono stati valutati utilizzando l'**ID Screen® Influenza H5 Indirect** ELISA (codice prodotto = FLUH5S) e l'**ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect** (codice prodotto = FLUNPS). In parallelo, il test HI è stato eseguito da CEVA PHYLAXIA utilizzando il ceppo HPAIV H5N8 (A/Belgium/chicken/U1700807 PTL807/2017). I campioni di sangue sono stati prelevati dagli animali a 55 e 57 settimane, ovvero 2 settimane dopo il l'inoculo. Sono stati calcolati i titoli medi, minimi, massimi e il CV%.

### *Monitoraggio dei volatili vaccinati con il vaccino H5 RNA*

I polli SPF sono stati vaccinati a 1 giorno e a 4 settimane di età con un vaccino H5 RNA (da Ceva Santé Animale) ed in seguito inoculati a 6 settimane di età con il ceppo H5N8 del virus influenzale. I titoli anticorpali sono stati valutati utilizzando l'**ID Screen® Influenza H5 Indirect** ELISA (codice prodotto = FLUH5S) e l'**ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect** (codice prodotto = FLUNPS). In parallelo, è stato eseguito anche il test HI utilizzando il ceppo HPAIV H5N8 (ceppo Belgium 2017 A/Brahma chicken/Belgium/6153/2017). I campioni di sangue sono stati prelevati dagli animali a 3, 4, 5, 6 e 8 settimane di età. Sono stati calcolati i titoli medi, minimi, massimi e il CV%.

Questa parte dello studio è stata effettuata da Sciensano (Belgio).

## **RISULTATI**

### *Studio della specificità del kit FLUH5S*

Le tabelle seguenti mostrano i risultati ottenuti per i diversi sottotipi testati da GD DEVENTER (Tabella 1) o FLI (Tabella 2):

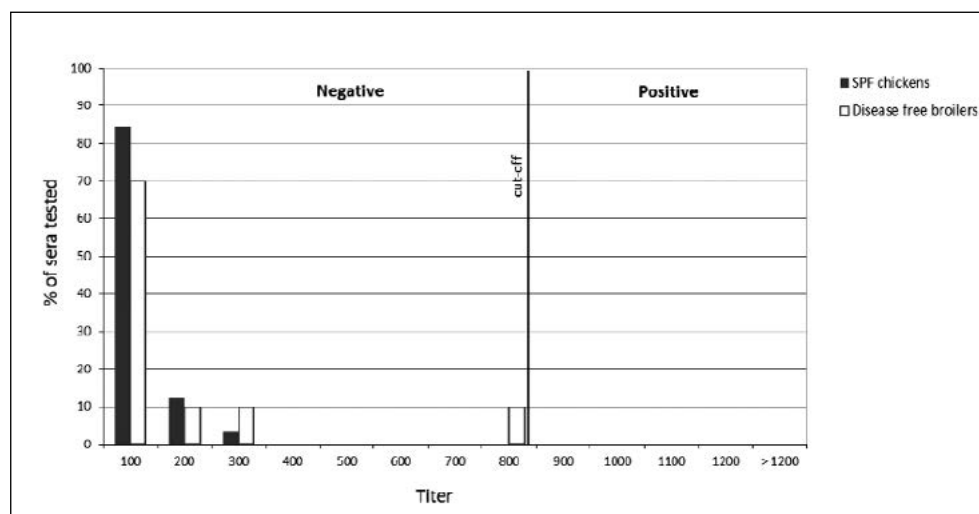
**Tabella 1:** Esclusività relativa al pannello  
Influenza di GD DEVENTER

	Risultati con il kit FLUH5S
H2N5	-
H2N9	-
H3N1	-
H5N2	+
H5N3	+
H6N2	-
H7N1	-
H7N7	-
H10N4	-
H11N6	-

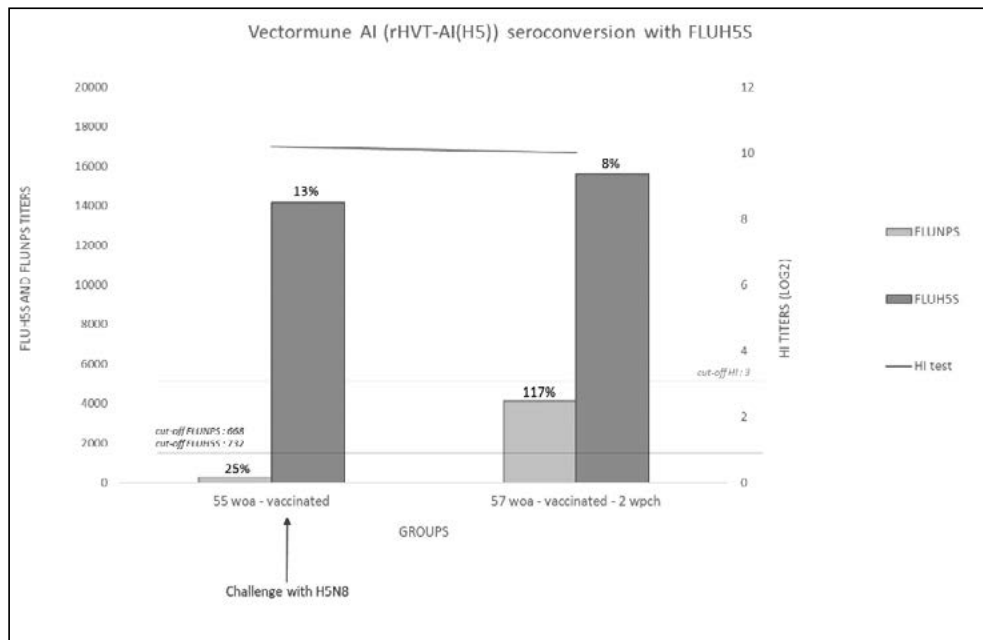
**Tabella 2:** Esclusività relativa al pannello  
influenza di FLI

	Risultati con il kit FLUH5S
H5N2 (VLDIA 042)	+
H5N8 (VLDIA 250)	+
H6 (VLDIA 131)	-
H7 (VLDIA 098)	-
H9 (VLDIA 113)	-

**Figura 1:** Specificità misurata con il kit FLUH5S = 100% (CI<sub>95%</sub>: 99,09% - 100%), n=420.



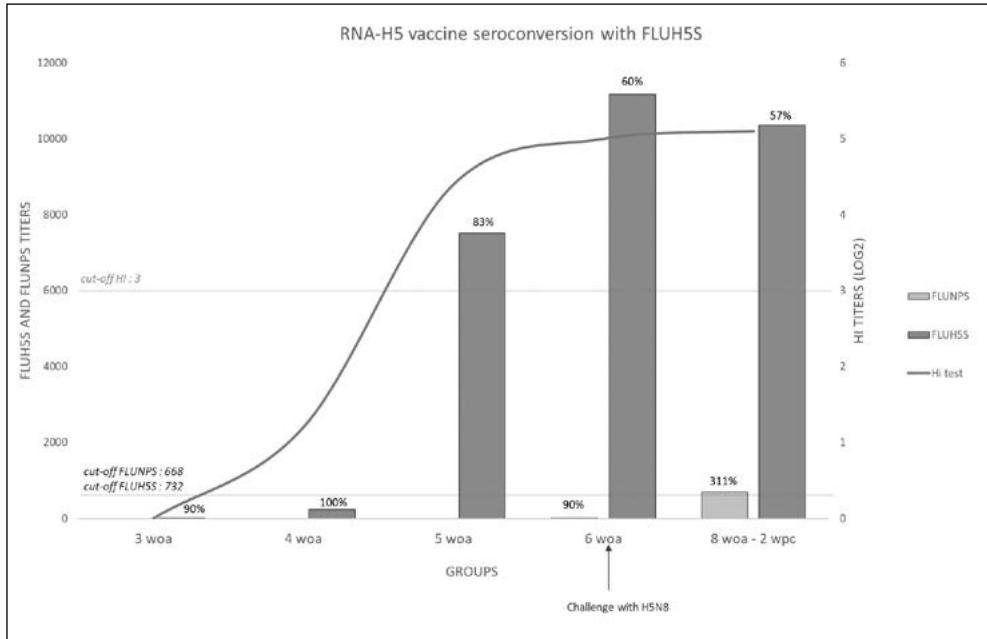
Monitoraggio dei volatili vaccinati con Vectormune AI (rHVT-AI(H5))  
 I risultati sono riportati di seguito (Figura 2):



Età del gruppo	55 settimane		57 woa settimane	
Kit ELISA	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S
Titolo medio	280	14158	4124	15633
CV%	25	13	117	8
%POS	0	100	80	100

**Figura 2:** Distribuzione del titolo dopo la vaccinazione con un vaccino ricombinante rHVT-H5 con i kit ELISA FLUH5S e FLUNPS di IDvet e con il test HI.

*Monitoraggio dei volatili vaccinati con il vaccino H5 RNA*  
I risultati sono riportati di seguito (Figura 3):



Età del gruppo	3 settimane		4 settimane		5 settimane		6 settimane		8 settimane – 2 settimane post-inoculo	
	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S
Titolo medio	/	11	/	244	/	7514	12	11168	701	10350
CV%	/	90	/	100	/	83	90	60	311	57
%POS	/	0	/	0	/	90	0	100	10	100

**Figura 3:** Distribuzione del titolo dopo la vaccinazione con un vaccino a RNA H5 con i kit FLUH5S e FLUNPS ELISA di IDvet e con il test HI.

### DISCUSSIONE

Dal momento che gli studi relativi a infezioni di campo sono ancora in corso, l'obiettivo principale di questo lavoro è quello di presentare i concetti generali di DIVA, nonché l'efficacia degli strumenti basati sui primi risultati di studi sperimentali, senza concentrarsi sui valori esatti del titolo attesi.

#### *Studio della specificità del kit FLUH5S*

I risultati mostrano che il kit FLUH5S è molto specifico per l'emoagglutinina H5, senza reazioni incrociate con altri sottotipi di influenza.

Inoltre, la specificità diagnostica di questo kit è risultata eccellente sui campioni SPF e sul pannello di campioni provenienti da animali esenti da malattia, con il 100% di negatività al test.

### *Monitoraggio dei volatili vaccinati con Vectormune AI (rHVT-AI(H5))*

I risultati mostrano che il kit FLUH5S è in grado di rilevare gli anticorpi sviluppati dopo la vaccinazione con vaccino ricombinante. Infatti, per i gruppi di 55 e 57 settimane di età, si ottengono titoli medi di circa 15 000 (il cut-off del kit è 732).

I risultati mostrano anche che il kit FLUH5S consente di monitorare la vaccinazione con una buona correlazione con il test HI.

D'altro canto, il kit FLUNPS può essere utilizzato come parte della strategia DIVA: negli animali sottoposti a challenge a 55 settimane di età, gli anticorpi sviluppati a causa del contatto con il ceppo di campo sono rilevabili 2 settimane dopo, con un titolo medio di circa 4000 (il cut-off del kit è 668).

### *Monitoraggio dei volatili vaccinati con vaccino H5 RNA - RISULTATI SCIENSANO*

Gli animali sono stati vaccinati a 1 giorno di età e poi a 4 settimane di età con il vaccino H5 RNA. I risultati mostrano chiaramente che il kit FLUH5S è in grado di rilevare gli anticorpi sviluppati dopo doppia vaccinazione a 1 giorno di età e a 4 settimane di età. A 5 settimane di età, il titolo medio ottenuto con il kit FLUH5S è di circa 8000 e > di 10 000 a 6 e 8 settimane di età.

Come in precedenza, i risultati mostrano anche che il kit FLUH5S consente di monitorare la vaccinazione ricombinante con una buona correlazione con il test HI.

Inoltre, anche in questo caso, il kit FLUNPS può essere utilizzato come parte della strategia DIVA: negli animali sottoposti a challenge a 6 settimane di età, si osserva un aumento a 8 settimane (2 settimane dopo il challenge), con un titolo medio di circa 700 (cut-off = 668).

## **CONCLUSIONI**

I risultati presentati dimostrano che il kit ELISA FLUH5S, che si basa su una proteina H5 ricombinante, è caratterizzato da un'elevata specificità per l'emoagglutinina H5. Questo kit permette anche una rilevazione affidabile degli anticorpi sviluppati dopo vaccinazione con vaccino rHVT-H5 o SRV-H5, presentando una buona correlazione con il test HI. Infine, il kit ELISA FLUH5S può essere utilizzato in associazione con il kit FLUNPS nel contesto di una strategia DIVA, che permette di distinguere gli animali vaccinati con vaccini ricombinanti dagli animali che sono venuti a contatto con un ceppo di campo.

Ringraziamenti: G. Dauphin (Ceva Santé Animale).

## **BIBLIOGRAFIA**

1. S. Reemers, I. Versteegen, S. Basten, W. Hubers, S. Van de Zande. Un vaccino vettore dell'influenza aviaria HVT-H5 ad ampio spettro che induce una rapida insorgenza dell'immunità. *Vaccine*, 39 (7) (2021), pp. 1072-1079, [10.1016/j.vaccine.2021.01.018](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.018)
2. F. Rauw, V. Palya, S. Van Borm, S. Welby, T. Tatar-Kis, Y. Gardin, *et al.* Ulteriori prove della deriva antigenica e dell'efficacia protettiva offerta da un vaccino ricombinante HVT-H5 contro la sfida con due ceppi HPAI H5N1 del clade 2.2.1 egiziano, antigenicamente divergenti. *Vaccine*, 29 (14) (2011), pp. 2590-2600, [10.1016/j.vaccine.2011.01.048](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.048)
3. D.R. Kapczynski, M. Esaki, K.M. Dorsey, H. Jiang, M. Jackwood, M. Moraes,

- et al.* Protezione vaccinale dei polli contro isolati di influenza aviaria altamente patogena H5 antigenicamente diversi con un vaccino vettore HVT vivo che esprime il gene dell'emoagglutinina dell'influenza derivato da un virus dell'influenza aviaria di clade 2.2. *Vaccine*, 33 (9) (2015), pp. 1197-1205, [10.1016/j.vaccine.2014.12.028](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.028)
4. Y. Li, K. Reddy, S.M. Reid, W.J. Cox, I.H. Brown, P. Britton, *et al.* Herpesvirus ricombinante dei tacchini come vaccino vettoriale contro l'influenza aviaria H7N1 ad alta patogenicità e la malattia di Marek. *Vaccine*, 29 (46) (2011), pp. 8257-8266, [10.1016/j.vaccine.2011.08.115](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.115)
  5. L. Liu, T. Wang, M. Wang, Q. Tong, Y. Sun, J. Pu, *et al.* Herpesvirus ricombinante di tacchino che esprime l'emoagglutinina H9 e che fornisce protezione contro l'influenza aviaria H9N2. *Virologia*, 529 (2019), pp. 7-15, [10.1016/j.virol.2019.01.004](https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.01.004)