

IMPIEGO DEL VACCINO RICOMBINANTE RN1250 PER IL CONTROLLO DELLA MALATTIA DI MAREK: CINETICA VACCINALE ED EFFICACIA IN RIPRODUTTORI PESANTI

Lupini C.¹, Quaglia G.¹, Benedetti V.², Mescolini G.¹, Prandini F.², Tovani A.³, Catelli E.¹

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

²*Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Milano*

³*Medico Veterinario*

Summary

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative disease of chickens spread throughout the world caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2). Production losses resulting from clinical disease and MD-associated condemnation have been significantly reduced since the introduction of vaccination. A vaccination program, including the recombinant vaccine strain RN1250 (Prevexxion® RN), CVI988/Rispens and HVT, was applied in 5 groups of broiler breeders in the pullet phase of an industrial farm. Longitudinal field studies were performed sampling environmental dust, feathers and spleens, collected from 1 to 19 weeks of age to detect GaHV-2 vaccines and/or field strains. The study revealed the uptake of the RN1250 vaccine strain, demonstrated by the detection of the vaccine virus in feathers and in spleens from the first to the fourth week post-vaccination. Circulation of a virulent field GaHV-2 strain was observed from the 14th week of age not associated with the presence of clinical outbreaks of MD, revealing the efficacy of the vaccination plan applied.

INTRODUZIONE

La malattia di Marek (MD) è una patologia neoplastica a carattere linfoproliferativo del pollo causata dal *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2 anche denominato MDV, che determina ingenti perdite economiche nel settore avicolo in tutto il mondo (Schat e Nair, 2013).

Gli ospiti recettivi si infettano tramite inalazione di particelle virali presenti nei detriti delle cellule epiteliali dei follicoli delle penne desquamate contenute nella polvere ambientale (Carrozza et al., 1973); il virus può permanere vitale ed infettante nelle polveri per diversi mesi (Jurajda e Klimes, 1970).

Negli allevamenti di ovaiole e riproduttori pesanti italiani circolano ceppi ad elevata virulenza (vMDV o vvMDV) in grado di determinare la forma acuta della malattia, caratterizzata da linfomi viscerali (Mescolini et al., 2019).

Le manifestazioni cliniche della malattia vengono tenute sotto controllo dalla vaccinazione con vaccini vivi attenuati che tuttavia vengono definiti “imperfetti” poiché non sono in grado di prevenire l'infezione (Read et al., 2015). I vaccini impiegati più largamente in Italia sono il ceppo CVI988/Rispens (attenuato a partire da un ceppo di campo di GaHV-2) e l'herpesvirus del tacchino (HVT), appartenente alla specie *Meleagrid alphaherpesvirus 1*, naturalmente apatogena per il pollo.

Recentemente è stato messo in commercio il vaccino ricombinante RN1250 (Prevexxion® RN, Boehringer Ingelheim Animal Health), costituito dal ceppo virale CVI988/Rispens in cui sono state inserite sequenze genomiche del ceppo Md5 (vvMDV) di GaHV-2, e del ceppo RM1 (vMDV); oltre ai segmenti Long Terminal Repeats (LTR) derivati dal retrovirus della Reticoloendoteliosi (REV).

Per valutare la cinetica del vaccino ricombinate RN1250 e verificare l'efficacia di un piano vaccinale che include RN1250, CVI988/Rispens e HVT, è stato svolto uno studio longitudinale di campo in cinque gruppi di riproduttori pesanti. Penne, milze e polveri ambientali sono stati testati mediante protocolli molecolari specifici per GaHV-2 e RN1250.

MATERIALI E METODI

Riproduttori pesanti oggetto dello studio e campionamento

Sono stati effettuati studi longitudinali in 5 gruppi di riproduttori pesanti di un allevamento industriale in cui in passato si erano verificati focolai di MD acuta in fase di deposizione.

Per il controllo della Malattia di Marek i gruppi erano stati vaccinati nei primi giorni di vita come indicato in Tabella 1.

Tabella 1. Programma vaccinale per MD nei gruppi oggetto di indagine.

ETA' E VIA DI SOMMINISTRAZIONE	VACCINI
18° giorno di incubazione - <i>In ovo</i>	Ceppo CVI988/Rispens + HVT
1 giorno di età – sottocutanea	Ceppo CVI988/Rispens + HVT
2 giorni di età – sottocutanea	Ceppo RN1250 (Prevexxion RN) e vHVT-IBD (Vaxxitek HVT+IBD), Boehringer Ingelheim

Il programma di vaccinazione, rispetto ai cicli d'allevamento precedenti, ha sostituito l'impiego dei ceppi vaccinali CVI988/Rispens e HVT con i vaccini Prevexxion RN e Vaxxitek HVT + IBD (Boehringer Ingelheim).

Dalla 1ª alla diciannovesima settimana di età, da ogni gruppo sono stati prelevati settimanalmente campioni di polvere ambientale e di penne (10 animali/gruppo, 5 penne/animale). Cinque animali per gruppo sono stati inoltre soppressi per la raccolta di campioni di milza.

Processazione del campione ed estrazione del DNA

Ciascun campione di polvere (1 ± 0.09 g) è stato posto in una provetta conica da centrifuga da 15 ml, risospeso in 5 ml di PBS sterile e centrifugato a 2500g per 15 minuti a +4°C. Il surnatante ottenuto è stato centrifugato una seconda volta utilizzando gli stessi parametri. Dopo la seconda centrifugazione, il surnatante è stato prelevato con una siringa e filtrato attraverso un filtro sterile per siringa da 0.45 µm. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da 200 µl di filtrato di polvere

utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL). Quest'ultimo kit è stato utilizzato anche per l'estrazione del DNA dalle penne e dalle milze, processate singolarmente o in pool.

PCR nested per RN1250 e per GaHV-2

Il DNA estratto è stato impiegato in due protocolli di nested PCR, uno per identificare la presenza di GaHV-2 e differenziare, mediante sequenziamento dell'amplificato, il ceppo vaccinale CVI988/Rispens (Mescolini et al., 2019) dai ceppi GaHV-2 di campo; e l'altro per amplificare una porzione univoca del ceppo RN1250, mediante *primers* specifici disegnati sulla base della sequenza nucleotidica del ceppo RM1 presente in GenBank (numero di accesso S82226).

RISULTATI

I risultati dell'indagine sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Positività alla PCR nested e caratterizzazione per RN1250, CVI988/Rispens e GaHV-2 nei gruppi oggetto di indagine

Età (settimane)	MILZE			PENNE			POLVERE		
	RN1250	CVI988/ Rispens	GaHV-2	RN1250	CVI988/ Rispens	GaHV-2	RN1250	CVI988/ Rispens	GaHV-2
1	6/25 ^a	11/25	0/25	10/50	18/50	0/50	0/5	0/5	0/5
2	8/25	15/25	0/25	0/30	15/30	0/30	0/5	5/5	0/5
3	6/25	13/25	0/25	0/30	27/30	0/30	0/5	5/5	0/5
4	0/5	2/5	0/5	1/10	10/10	0/10	0/5	5/5	0/5
6	0/5	2/5	0/5	0/10	6/10	0/10	0/5	5/5	0/5
10	1/5	0/5	0/5	0/10	2/10	0/10	2/5	5/5	0/5
14	-	-	-	-	-	-	1/5	5/5	1/5
17	-	-	-	-	-	-	3/5	5/5	3/5
19	0/5	0/5	0/5	0/10	1/10	0/10	0/5	5/5	3/5

^a: n. positivi/n. campioni;

-: campionamento non effettuato.

Alla nested PCR per il ceppo vaccinale RN1250 sono risultate positive le milze prelevate dagli animali alla 1^a, 2^a, 3^a e 10^a settimana di vita, le penne prelevate alla 1^a e 4^a settimana di vita e le polveri ambientali prelevate dalla 10^a alla 17^a settimana di vita. Il ceppo vaccinale CVI988/Rispens è stato rilevato nelle milze dalla 1^a alla 6^a settimana di vita e in penne e polveri durante tutto il periodo di campionamento. La presenza del ceppo GaHV-2 di campo è stata rilevata solo più tardivamente nelle polveri a partire dalla quattordicesima settimana di vita.

All'analisi di sequenza i ceppi di campo presentavano caratteristiche molecolari di elevata virulenza, tuttavia, nel periodo di osservazione non sono state riportate manifestazioni cliniche o lesioni ascrivibili a MD.

DISCUSSIONE

Questo studio ha evidenziato l'avvenuto *uptake* del ceppo vaccinale RN1250, dimostrato dalla presenza del virus vaccinale nelle penne e nelle milze dalla prima alla quarta settimana post-vaccinazione. La positività al vaccino ricombinante sin dai primi giorni di vita potrebbe indicare la capacità del ceppo RN1250 di stimolare una precoce protezione immunitaria, che, oltre a proteggere l'animale nei riguardi di un challenge precoce da MDV, diminuisce la circolazione del ceppo di campo riducendo la probabilità di selezione di ceppi a maggiore virulenza. L'eliminazione di RN1250 avviene in maniera costante come testimoniato dall'accumularsi progressivo del virus vaccinale nelle polveri ambientali che sono risultate positive a partire dalla decima settimana post-vaccinazione; l'apparente intermittenza dell'eliminazione del ceppo vaccinale RN1250, rilevata testando le penne, è probabilmente dovuta al comportamento tipico di latenza/replicazione degli herpes virus (Calnek & Witter, 2001).

In questo studio longitudinale è stata rilevata la presenza di un ceppo di campo di GaHV-2 ad elevata virulenza a partire dalla quattordicesima settimana post-vaccinazione. È importante precisare che i vaccini oggi in commercio sono definiti imperfetti o "leaky", ossia, seppur capaci di tenere sotto controllo la malattia di Marek in forma clinica, non in grado di impedire l'infezione, la replicazione e l'eliminazione nell'ambiente di ceppi di campo di GaHV-2 ad elevata virulenza (Islam & Walkden-Brown, 2007; Islam et al., 2008; Islam et al., 2014; Ralapanawe et al., 2016). Tuttavia, nonostante la rilevazione del ceppo di campo nei gruppi oggetto di studio, non sono state osservate forme cliniche e/o lesioni riferibili a MD nell'arco di tutto il ciclo produttivo dei riproduttori, indice dell'efficacia protettiva del protocollo vaccinale applicato, nel periodo di osservazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Calnek, B. W., & Witter, R. L. (2001). Malattia di Marek. In B. W. Calnek, J. H. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, & Y. M. Saif, *Patologia Aviaria* (p. 411-446). Città di Castello (PG): Editorial board for the American Association of Avian Pathologists.
2. Carrozza, J.H., Fredrickson, T.N., Prince, R.P. & Luginbuhl, R.E. (1973). Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease. *Avian Dis.* 17: 767-781.
3. Jurajda, V. & Klimes, B. (1970). Presence and survival of Marek's disease agent in dust. *Avian Dis.* 14:188-190.
4. Islam, A., & Walkden-Brown, S. W. (2007). Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *J. Gen. Virol.* 88(pt8), 2021-2028.
5. Islam, A., Walkden-Brown, S. W., Groves, P. J., & Underwood, G. J. (2008). Kinetics of Marek's disease virus (MDV) infection in broiler chickens 1: effect of varying vaccination to challenge interval on vaccinal protection and load

- of MDV and herpesvirus of turkey in the spleen and feather dander over time. *Avian Pathol.* 37(3), 225-235.
6. Islam, T., Walkden-Brown, S. W., Ren, K. G., Islam, A., & Ralapanawe, S. (2014). Replication kinetics and shedding of very virulent Marek's disease virus and vaccinal Rispens/CVI988 virus during single and mixed infections varying in order and interval between infections. *Vet. Microbiol.*, 173(3-4), 208-23.
 7. Mescolini G., Lupini C., Davidson I., Massi P., Tosi G. & Catelli. E. (2019). Marek's disease viruses circulating in commercial poultry in Italy in the years 2015-2018 are closely related by their meq gene phylogeny. *Transbound Emerg Dis.*
 8. Ralapanawe, S., Walkden-Brown, S. W., Islam, A., & Renz, K. G. (2016). Effects of Rispens CVI988 vaccination followed by challenge with Marek's disease viruses of differing virulence on the replication kinetics and shedding of the vaccine and challenge viruses. *Vet. Microbiol.* 183, 21-9.
 9. Read, A.F., Baigent, SJ, Powers, C., Kgosana, L.B., Blackwell, L., Smith, L.P., Kennedy, D.A., Walkden-Brown, S.W. & Nair V.K. (2015). Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. *PLOS Biology* 13: e1002198.
 10. Schat, K.A. & Nair. V. (2013). Marek's disease. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, and V Nair (Eds.), *Diseases of Poultry* 13th edn, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, pp.515-552.