

STUDIO *IN VIVO* DELL'EFFICACIA DI UN SISTEMA DI LAMPADE A UVC A 222 NM PER L'INATTIVAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA

Tucciarone C.M.¹, Cecchinato M.^{1,2}, Vianello L.¹, Simi G.³, Morandin M.⁴, Borsato E.³, Silvestrin L.³, Giorato M.³, Salata C.⁵, Greggio E.⁶, Drigo M.¹

¹ *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (PD), Italia;*

² *Dipartimento di Biomedicina Comparata e Anatomia (BCA), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (PD), Italia;*

³ *Dipartimento di Fisica e Astronomia (DFA), Università degli Studi di Padova, Via Francesco Marzolo, 8, 35121 Padova, Italia;*

⁴ *Sezione di Padova dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), Via Francesco Marzolo, 8, 35131 Padova, Italia;*

⁵ *Dipartimento di Medicina Molecolare (DMM), Università degli Studi di Padova, Via Gabelli 63, 35121 Padova, Italia;*

⁶ *Dipartimento di Biologia (DiBio), Università degli Studi di Padova, Viale Giuseppe Colombo, 3, 35131 Padova, Italia.*

Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is one of the most important pathogens in poultry. IBV is a coronavirus featured by an airborne transmission, that is mostly controlled by biosecurity and vaccination. Due to the importance of implementing new tools to control this problem and to the renewed interest towards coronavirus, the efficiency of UVC lamps (222 nm) at inactivating IBV was tested on aerosol containing a nebulized vaccine. The aerosol was produced by an instrument nebulizing the vaccine and hosting the UVC lamps. The aerosol was administered to two groups of day-old chicks that were monitored for clinical signs, sampled by choanal swabs daily for 9 days post exposure and tested by vaccine specific real time RT-PCR. The first group was the control one, for the evaluation of the efficacy of the nebulizing instrument and the administration route, thus the lamps were switched off and allowed the vaccine take by the animals and the detection of increasing vaccine titers in the first days, attesting the replication of the live vaccine. The second group was exposed to the aerosol once exposed to the UVC rays, thus the animals remained negative for all observation period, revealing the efficacy of the UVC lamps in inactivating the virus below the necessary infectious dose. These results are promising for a wider application of the UVC lamps, both in veterinary field and in public health.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva (IBV) è un patogeno estremamente importante in avicoltura, responsabile di problematiche respiratorie, renali e riproduttive, a seconda del ceppo virale e della categoria animale coinvolti, con cali di produzione, perdite economiche e predisposizione ad infezioni secondarie (Jackwood & Wit, 2020). Il controllo della bronchite infettiva è demandato alla vaccinazione, che prevede la somministrazione di vaccini vivi attenuati e talvolta inattivati, a seconda del proto-

collo e della categoria produttiva (Jordan, 2017).

L'immunizzazione però non garantisce la totale protezione nei confronti di questo virus, proprio per la presenza di varianti, per il *coverage* vaccinale a volte subottimale della popolazione, per l'estrema facilità di trasmissione e per i contatti molto stretti all'interno dei capannoni. Oltre alla biosicurezza, altri devono essere quindi gli strumenti affiancati alla vaccinazione nella lotta contro questo ed altri patogeni. La ricerca di soluzioni in grado di abbattere la carica virale e la pressione infettante in ambienti ad elevata contaminazione, ha stimolato la valutazione dell'efficacia delle lampade a UVC nell'inattivazione dei coronavirus. Le lampade a UVC ad eccimeri (222nm) hanno il vantaggio di non essere nocive per gli organismi superiori e sono state già sperimentalmente testate nei confronti di patogeni come il virus dell'influenza aviaria (Welch et al., 2018) e il virus della Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) (Li et al., 2021), con l'obiettivo di sondare uno strumento applicabile sia in ambito veterinario, sia con una visione One Health con applicazione in contesti pubblici.

Questo studio ha valutato l'efficacia di lampade a UVC ad eccimeri (222 nm), nell'inattivare un aerosol contenente IBV e nel prevenirne la replicazione all'interno di un modello di popolazione animale esposta ad un patogeno a trasmissione tramite aerosol.

MATERIALI E METODI

Scelta del virus

Per effettuare lo studio in massima sicurezza, è stato scelto di utilizzare un vaccino vivo attenuato basato sul ceppo 1/96 del virus della bronchite infettiva (Cevac IBird®, Ceva Animal Health Ltd, France), registrato per la somministrazione via spray a pulcini di un giorno di vita. Due fiale da 1000 dosi sono state riospese in 100 ml ciascuna e utilizzate per la soluzione destinata alla produzione dell'aerosol contenente il virus.

Allestimento dello strumento di nebulizzazione e irraggiamento dell'aerosol

Lo strumento per la produzione dell'aerosol è stato predisposto dalla Divisione di Padova dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) e dal Dipartimento di Fisica e Astronomia (DFA) a partire dal prototipo descritto da Welch et al. (2018). Il flusso d'aria era prodotto da una bombola di azoto compresso, connessa ad un riduttore di pressione con uno sdoppiatore, prima dell'ingresso in un flussimetro a galleggiante per la regolazione dei flussi. Una parte del flusso era diretta alla produzione dell'aerosol nel nebulizzatore, in cui era stato diluito il vaccino, l'altra parte del flusso raggiungeva direttamente il tunnel di irraggiamento per la produzione di aria secca. A valle del nebulizzatore era posto un tunnel metallico in cui erano alloggiati le lampade a UVC ad eccimeri (222 nm), raggiunto dai tubi provenienti dal nebulizzatore e dal flussimetro. All'interno del tubo erano stati alloggiati quattro deflettori e all'estremità è stato posto un contenitore per alloggiare gli animali durante l'esposizione al flusso.

Settaggio dello strumento di nebulizzazione e irraggiamento

Lo strumento è stato regolato per nebulizzare 10 ml di soluzione contenente il vaccino in un tempo di 40 minuti di esposizione, somministrando 9 l/min di azoto e 4.5

l/min di aerosol, generato ad una velocità di 1.5cm/s, permettendo un'esposizione agli UVC di 10 secondi, con una dose di irraggiamento minimo di 8.7 mJ/cm² (dose media 13.6 mJ/cm²) e un fattore di inattivazione di 10⁷. Le lampade sono rimaste spente durante l'esposizione del primo gruppo (gruppo A) in modo da verificare il corretto funzionamento dello strumento attraverso il ritrovamento del vaccino, mentre sono state accese soltanto durante la produzione dell'aerosol a cui è stato esposto il secondo gruppo di animali (gruppo B).

Prova in vivo

Due gruppi di 20 pulcini di broiler di un giorno di vita sono stati arruolati per l'esecuzione del trial. Le due prove sono state effettuate con un intervallo di sette giorni l'una dall'altra, per garantire un vuoto sanitario e le corrette procedure di disinfezione. Gli animali sono stati alloggiati in contenitori uguali durante l'esposizione al flusso e rispettando le stesse condizioni ambientali e di alimentazione per i seguenti nove giorni di osservazione. Quindici animali per gruppo sono stati identificati singolarmente con un numero progressivo su targhette apposte al piede. Gli animali sono stati osservati individualmente e quotidianamente per il rilievo di eventuali segni clinici.

Campionamento e analisi di laboratorio

I pulcini di entrambi i gruppi sono stati campionati all'arrivo e prima di essere esposti all'aerosol, mediante tamponi in fessura palatina, per la ricerca della presenza del vaccino e il primo punto di campionamento è stato analizzato in pool, per escludere contaminazioni avvenute in incubatoio. Gli animali identificati (1-15) sono poi stati campionati quotidianamente e individualmente. I campioni dei due gruppi sono stati stoccati a -80°C fino alla fine del periodo di osservazione, per essere poi analizzati separatamente, per evitare contaminazioni. I campioni sono stati sottoposti individualmente ad estrazione degli acidi nucleici mediante il kit High Pure Viral Nucleic Acid® Kit (Roche, Svizzera) e analizzati mediante una metodica di real time RT-PCR specifica per il ceppo 1/96, descritta da Tucciarone et al. (2018) *the usual second vaccination is more and more often moved up to the chick's first d of life. The second strain administration together with the common Mass priming by spray at the hatchery allows saving money and time and reducing animal stress. The present work compared the different vaccine strains (Mass-like or B48, and 1/96 con il kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) sul termociclatore LightCycler® 96 Instrument (Roche, Svizzera).*

RISULTATI

Durante le due prove non è stata osservata mortalità. Entrambi i pool di tamponi prelevati prima dell'esposizione al flusso sono risultati negativi. Alcuni degli animali del gruppo A, esposto all'aerosol non irraggiato, hanno mostrato sintomi respiratori lievi e sporadici, con un picco al quarto giorno post esposizione. Tutti i campioni prelevati nel gruppo A sono risultati positivi fino al quinto giorno, con un trend in aumento del titolo virale, successivamente sono state evidenziate delle positività intermittenti e i titoli riscontrati sono apparsi meno omogenei (Figura 1).

Nessun animale del gruppo B ha mostrato sintomi né è risultato positivo alla real time RT-PCR specifica per il ceppo 1/96.

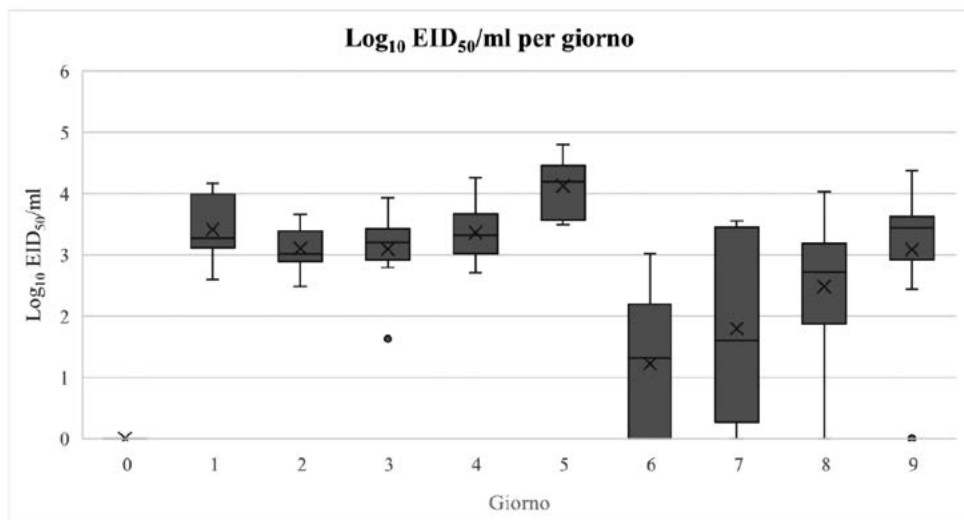


Figura 1: Box plot dei titoli virali nel gruppo A (x = media del gruppo).

DISCUSSIONE

Questo studio ha permesso di valutare l'efficacia di lampade a UVC ad eccimeri (222 nm) nell'inattivare il virus della bronchite infettiva aviaria. La positività degli animali del primo gruppo e l'aumento dei titoli virali nei primi giorni di osservazione dimostrano infatti il buon funzionamento del sistema di nebulizzazione e l'assenza di un'attività virucida meccanica da parte del prototipo, data la replicazione vaccinale che sottende al rapido aumento dei titoli. Al contrario, l'assenza di RNA vaccinale negli animali del gruppo B è imputabile all'azione virucida delle lampade accese, essendo questa l'unica differenza tra i due gruppi.

La presenza di lievi sintomi nel gruppo A è interpretabile come una blanda reazione vaccinale, probabilmente causata da due principali differenze nella somministrazione rispetto alle condizioni standard previste in incubatoio. Infatti, nonostante il vaccino sia assunto per via inalatoria anche in incubatoio, le condizioni ottimali di vaccinazione prevedono la produzione di uno spray con particelle di diametro maggiore, in modo da evitare una penetrazione troppo profonda del vaccino nelle vie aeree. Durante la presente prova, sono state prodotte invece delle particelle di dimensioni inferiori, per mimare l'aerosol con cui i patogeni si propagano in infezioni naturali. Inoltre, per garantire la nebulizzazione corretta del vaccino e minimizzarne la dispersione, è stata utilizzata una dose maggiore. L'insieme di questi due fattori, volume delle particelle e dose di vaccino, potrebbero aver contribuito ad accentuare gli effetti solitamente trascurabili della vaccinazione contro IBV. La dose di vaccino maggiore potrebbe anche aver contribuito alla precoce positività degli animali che, in altri studi di cinetica (Pellattiero et al., 2018; Tucciarone et al., 2018; Tucciarone et al., 2018) we tested the potential environmental persistence, transmission ability and replication capability of a non-directly administered vaccine strain

at a hatchery and during transportation. To this purpose, we examined a single hatchery, where combined vaccination (Mass-like plus 793B-like strains effettuati dopo vaccinazione spray standard, mostravano le prime positività generalmente a partire dal secondo giorno post esposizione).

CONCLUSIONI

La conferma dell'efficacia delle lampade a UVC nell'inattivazione di un coronavirus è un risultato estremamente importante e promettente. Una volta ottimizzati il funzionamento, la potenza e i costi, queste lampade potrebbero trovare ampio utilizzo in ambito veterinario, negli allevamenti per sanificare i flussi d'aria in ingresso e in uscita, nella dogana danese, o anche in incubatoio, dove sono somministrate dosi elevate di diversi vaccini vivi attenuati, per prevenire le cross-contaminazioni. Allo stesso modo, l'efficacia contro virus di interesse per la salute umana, come appunto i coronavirus, le rende uno strumento interessante per l'applicazione anche in situazioni ad elevato rischio e contaminazione, come strutture ospedaliere e spazi pubblici affollati. Infatti, i raggi generati da questo tipo di lampade non sono dannosi per gli organismi superiori e ciò potrebbe offrire la possibilità di utilizzarle per diminuire la pressione infettante negli ambienti anche in presenza di persone o animali, al posto di soluzioni più impattanti come l'ozonizzazione. I risultati finora ottenuti dall'utilizzo delle lampade a UVC ad eccimeri (222 nm) sono estremamente promettenti, ma ulteriori studi devono essere condotti per misurarne l'efficacia in contesti d'uso diversi e assicurare la sicurezza dell'utilizzo anche a dosi elevate di irraggiamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Jackwood, M. W., & Wit, S. (2020). Infectious Bronchitis. In *Diseases of Poultry* (pp. 167–188). Wiley.
2. Jordan, B. (2017). Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Veterinary Microbiology*, 206, 137–143.
3. Li, P., Koziel, J., Zimmerman, J., Zhang, J., Cheng, T.-Y., Yim-Im, W., Jenks, W., Lee, M., Chen, B., & Hoff, S. (2021). Mitigation of Airborne PRRSV Transmission with UV Light Treatment: Proof-of-Concept. *Agriculture*, 11(3), 259.
4. Pellattiero, E., Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Koutoulis, K., Meini, A., Zangrandi, C., Ramon, G., Drigo, M., & Cecchinato, M. (2018). Evaluation of unintended 1/96 infectious bronchitis vaccine transmission in broilers after direct contact with vaccinated ones. *Veterinarni Medicina*, 63(06), 287–291.
5. Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., Catelli, E., & Cecchinato, M. (2018). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-Time RT-PCR quantification. *Poultry Science*, 97(1), 303–312.
6. Tucciarone, Claudia M., Franzo, G., Bianco, A., Berto, G., Ramon, G., Paulet, P., Koutoulis, K. C., & Cecchinato, M. (2018). Infectious bronchitis virus gel vaccination: evaluation of Mass-like (B-48) and 793/B-like (1/96) vaccine kinetics after combined administration at 1 day of age. *Poultry Science*, 97(10), 3501–3509.
7. Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis vi-

rus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349–364.

8. Welch, D., Buonanno, M., Grilj, V., Shuryak, I., Crickmore, C., Bigelow, A. W., Randers-Pehrson, G., Johnson, G. W., & Brenner, D. J. (2018). Far-UVC light: A new tool to control the spread of airborne-mediated microbial diseases. *Scientific Reports*, 8(1), 2752.
9. Zappulli, V., Ferro, S., Bonsembiante, F., Brocca, G., Calore, A., Cavicchioli, L., Centelleghè, C., Corazzola, G., De Vreese, S., Gelain, M. E., Mazzariol, S., Moccia, V., Rensi, N., Sammarco, A., Torrigiani, F., Verin, R., & Castagnaro, M. (2020). Pathology of Coronavirus Infections: A Review of Lesions in Animals in the One-Health Perspective. *Animals*, 10(12), 2377.