

- Lenz SD, Hoerr FJ, Ellis AC, Toivio-Kinnucan MA, Yu M. (1998). Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and *Reoviruses* isolated from broiler chickens in Alabama. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 145-151.
- Ottiger HP. (2010). Development, standardization and assessment of PCR systems for purity testing of avian viral vaccines. *Biologicals.* 38: 381-388.
- Pantin-Jackwood MJ, Day JM, Jackwood MW, Spackman E. (2008). Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. *Avian Dis.* 52: 235-244.
- Romanova N, Corredor JC, Nagy É. (2009). Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 159: 58-63.
- Songserm T, van Roozelaar D, Kant A, Pol J, Pijpers A, Ter Huurne A. (2003). Enteropathogenicity of Dutch and German avian *Reoviruses* in SPF white leghorn chickens and broilers. *Vet. Res.* 34: 285-295.
- Van Loon AAWM, Koopman HC, Kosman W, Mumczur J, Szeleszczuk O, Karpinska E, Kosowska G, Lütticken D. (2001). Isolation of a new serotype of avian *Reovirus* associated with malabsorption syndrome in chickens. *Vet. Quart.* 23: 129-133.

PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI* E *CAMPYLOBACTER LARI* IN BROILER REGOLARMENTE MACELLATI; PROFILO DI ANTITIBIOTICO RESISTENZA

Fiorentini L.¹, Tosi G.¹, Milandri C.², Usberti R.², Rosetti M.², Ricci G.², Casadio M.¹, Massi P.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna
Sezione diagnostica di Forlì

² Azienda Unità Sanitaria Locale della Romagna, distretto di Forlì,
area Sanità Pubblica

Summary

Thermophilic *Campylobacter spp.* have been recognized as major cause of foodborne infections in many countries throughout the world. Poultry meat is the most common source for foodborne cases of human campylobacteriosis. In order to study the prevalence of *Campylobacter* in broiler chickens a study was carried out in a slaughterhouse during 2012. The study was performed on 50 flocks. The overall prevalence of the *Campylobacter spp.* infection was 76% of the tested flocks. The prevalence of the *C. jejuni* infection was 36%, *C. coli* 32%, association *C. jejuni* and *C. coli* 6% and *C. lari* infection 2% of the tested flocks. In the second part of the study twenty *Campylobacter* strains (ten strains of *C. jejuni* and ten strains of *C. coli* from skin and ceca), were tested by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for their susceptibility to Penicilin, Betalactams, Macrolides, Tetracyclines, and Fluoroquinolones. All isolated strains of *Campylobacter* were fully susceptible to Penicilin. Low resistance were detect for Amoxicillin ranging from 10% and 20%. Very high resistance rates were detect for Macrolides (ranging from 10% and 60%), Tetracyclines (60%), and Fluoroquinolones (ranging from 40% and 50%). No isolates showed resistance to Tiamulina. *Campylobacter* is a leading foodborne bacterial pathogen, which causes gastroenteritis in humans. This pathogenic organism is increasingly resistant to antibiotics, especially Fluoroquinolones and Macrolides, which are the most frequently used antimicrobials for the treatment of campylobacteriosis when clinical therapy is warranted. For this reason, the study's antibiotic resistance is a major public health problem and current.

INTRODUZIONE

Dal 2005 l'infezione zoonotica segnalata con maggior frequenza nell'uomo è la Campilobatteriosi di cui si è registrato un continuo aumento del numero di casi negli ultimi anni. Con oltre 190.000 episodi di malattia diagnosticati ogni anno nell'uomo, rappresenta la zoonosi alimentare più frequentemente segnalata nell'Unione Europea (UE). La principale fonte d'infezione è il consumo di carne di pollame poco cotta o di prodotti alimentari pronti per l'uso venuti a contatto con carne di pollame cruda. La manipolazione sicura della carne cruda e di altri ingredienti alimentari crudi, una buona cottura ed un'attenta igiene, possono prevenire o ridurre il rischio posto dai cibi contaminati. Al fine di proteggere i consumatori da questa minaccia alla salute pubblica, l'Unione Europea ha adottato un approccio integrato alla sicurezza alimentare che coinvolge l'intera

filiera, dall'allevamento alla tavola. Tale approccio si basa sull'analisi dei dati di prevalenza e antibiotico-resistenza e sulla valutazione dei rischi posti da questo battere. Gli studi condotti dall'UE, hanno riscontrato un'elevata prevalenza di *Campylobacter* nel pollo da carne. In media il battere è stato rinvenuto a livello intestinale nel 71% dei casi (dato Europeo) e nel 72,3% dei casi (dato Italiano). Sul totale dei ceppi batterici isolati, il 60% era rappresentato da *C. jejuni*; il 45% da *C. coli* e lo 0,2% da *C. lari*. (Di Giannatale E. *et al*, 2010; Ricci A. *et al*, 2006). In Emilia Romagna, nel 2008, sono stati analizzati 100 lotti di macellazione: la ricerca di *Campylobacter spp.* termofili in campioni ciecali, ha evidenziato positività nel 52% dei lotti testati. (Rugna *et al*, 2009) Le conoscenze sulle vie di contaminazione del pollame in allevamento non sono ancora del tutto definite, ma il livello di biosicurezza, la stagionalità, l'età degli animali, l'alimento e le terapie somministrate sono tutti fattori fortemente correlati alla diffusione del *Campylobacter* negli allevamenti avicoli. La contaminazione delle carni avviene durante le fasi di macellazione, attraverso il contatto con materiale fecale. Per questo motivo, la fase di eviscerazione risulta un punto critico, questo perché negli avicoli e, specialmente nel broiler, la colonizzazione del *Campylobacter* avviene in maniera imponente e asintomatica a livello ciecale. Quest'ultima evidenza risulta essere di particolare rilevanza in quanto dimostra come il *Campylobacter* possa così facilmente raggiungere il consumatore attraverso il consumo di alimenti contaminati. Lo studio condotto si è posto quindi l'obiettivo di valutare la prevalenza del *Campylobacter* in un importante macello avicolo di portata industriale e di aumentare le conoscenze relative all'antibiotico-resistenza del battere isolato nel corso della stessa sperimentazione. L'antibiotico-resistenza è un problema di Sanità Pubblica estremamente attuale e l'approfondimento delle conoscenze in tale settore è considerato strategico per la salute e la tutela dei consumatori.

MATERIALI E METODI

Campionamento

I prelievi sono stati eseguiti in un macello avicolo industriale dell'Emilia Romagna dove annualmente vengono macellati 31.000.000 polli in filiera integrata. Si tratta di un macello completamente automatizzato, con un sistema di stordimento degli animali di tipo elettrico (elettronarcosi) e con eviscerazione meccanica. Le carcasse eviscerate vengono in parte commercializzate tal quali, la restante parte, viene sezionata e sottoposta a lavorazioni con produzione di carni fresche, preparazioni carnee e prodotti a base di carne. Tutte le fasi della macellazione, fino alla produzione dei busti eviscerati e del sezionamento sono automatizzate.

Lo studio è stato condotto tra maggio e dicembre 2012. Sono stati analizzati 50 diversi lotti di macellazione (lotto = partita di polli da carne allevati nello stesso gruppo e condotti al macello lo stesso giorno), 9 lotti provenienti da aziende con un numero di capi compresi tra 10000 e 49000, 11 lotti da aziende con un numero di capi compresi tra 50000 e 99000, la maggior parte dei lotti, 30, da aziende con un numero di capi > di 100000. Gli allevamenti oggetto dello studio erano 39 distribuiti in 9 province italiane.

Da ogni lotto sono stati scelti 10 soggetti a random, da ciascun soggetto, nella fase di eviscerazione, è stato prelevato un campione di cute alla base del collo di circa 25 gr, tonsille ciecali e ciechi integri, fegato con cistifellea sempre integra. Tutti i

campioni sono stati singolarmente introdotti in contenitori sterili ed identificati per soggetto quindi refrigerati. Le analisi di laboratorio sono state condotte lo stesso giorno del prelievo al macello.

Prove microbiologiche

La procedura di isolamento del *Campylobacter* è stata effettuata con una metodica in accordo alla ISO 10272-1:2006, tale prova è stata applicata anche alla matrice "ciechi" non contemplati nel campo di applicazione del metodo, previa diluizione e filtrazione degli stessi campioni. Per i campioni di ciechi, a livello di tonsille ciecali, sono state condotte indagini microbiologiche in parallelo mediante semina diretta su terreno solido selettivo Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCD) e Columbia Blood Agar (CBA). Tutti i ceppi di *Campylobacter* isolati sono stati sottoposti ad identificazione di specie mediante l'impiego di Kit biochimici miniaturizzati, quindi liofilizzati, allo scopo di essere sottoposti contemporaneamente alle prove di antibiotico resistenza.

Prove biomolecolari

Tutti i campioni, a partire dal terreno di arricchimento Bolton Broth, dopo 24 ore di incubazione a 41,5°C in condizione di microaerofilia, sono stati sottoposti a PCR Real - Time iQ-Chek™ *Campylobacter* Kit (Bio-Rad), metodo interno per la ricerca di *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* da matrici alimentari. Per i campioni positivi in PCR Real-Time, è stata effettuata una seconda reazione di PCR RealTime multiplex finalizzata all'identificazione di *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* mediante l'utilizzo di sonde Taqman (Mayr *et al.*, 2010; Best *et al.*, 2003). Le sequenze dei primer e delle sonde utilizzate sono riportate in tabella. Solo nel caso di *C. lari* sono state utilizzate due coppie di primer ed una sonda, sono invece inclusi una coppia di primer ed una sonda per l'identificazione di *C. jejuni* ed una coppia di primer ed una sonda per l'identificazione di *C. coli*. Le mix di reazione sono allestite in 25µl totali contenenti: 300nM di ogni primer, 100nM di ogni sonda, 12,5µl di Taqman Universal PCR Master mix (Applied Biosystems) e 5 µl di DNA estratto. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C per 10 min), 45 X (95°C per 30 sec; 60°C per 45 sec, 72°C per 30 sec).

Target	Oligonucleotide	Sequenza	Referenza
<i>C. jejuni</i>	mapA-fw	CTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATT	Mayr et al., 2010
	mapA-rev	AATACCAGTGTCTAAAGTGCCTTTAT	
	mapA-probe	HEX-TTGAATCCAACATCGCTAATGTATAAAAGCCCTTT	
<i>C. coli</i>	ceuE-fw	AAGCTCTTATTGTTCTAACCAATTCTAACA	Best et al., 2003
	ceuE-rev	TCATCCACAGCATTGATTCCTAA	
	ceuE-probe	Cy5-TTGGACCTCAATCTCGCTTTGGAATCATT	
<i>C. lari</i>	GyrA1-fw1	GATAAAGATACGTTTGATTTGTACC	Best et al., 2003
	GyrA1-fw2	GAAAAAGATACAGTTGATTTTATACC	
	GyrA1-re1	CAGCTATACCACTTGATCCATTAAG	
	GyrA1-re2	TGCAATACCACTTGAACCATTA	
	GyrA1-probe	FAM-TTATGATGATTCTATGAGTGAGCCTGATG	

Valutazione della sensibilità agli antibiotici

Sono state condotte prove *in vitro* di sensibilità agli antibiotici per i ceppi isolati attraverso la tecnica della Minima Concentrazione Inibente (MIC) (Andrews J.M., 2001). Sono state impiegate piastre microtiter a 96 pozzetti contenenti 1 µg di diversi antibiotici disidratati impiegati in campo umano e veterinario, in tutto 9 molecole tra Betalattamici, Fluorochinoloni, Tetracicline, Macrolidi ed una Pleuromutilina

E' stato allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame di *Campylobacter*. a partire da un'emulsione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario 0.5. Fasi seguenti:

- Inoculazione di 100 µl di sospensione standardizzata in 11 ml di Bolton Broth.
- Inoculazione di tutti i pozzetti con 100 µl di sospensione batterica per pozzetto.
- Incubazione per 18-24 ore a 41,5°C in microaerofilia.
- Lettura dei risultati: la MIC è stata calcolata in base all'ultimo pozzetto che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico le MIC sono state definite come maggiori-uguali (≥) rispetto alla concentrazione più alta. Quando non si verificava crescita batterica in tutte le concentrazioni, le MIC sono state registrate come minori o uguali (≤) rispetto alla concentrazione più bassa.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Prove microbiologiche e studio di prevalenza

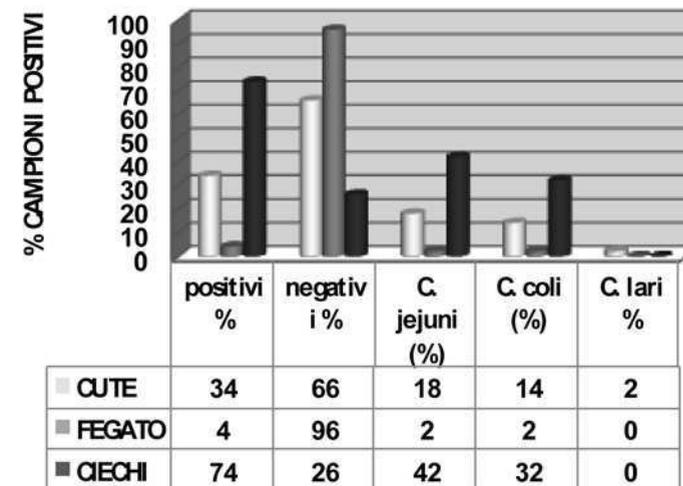
Sono stati sottoposti ad indagine microbiologica finalizzata all'isolamento ed identificazione del *Campylobacter* un totale di 1500 campioni:

50 lotti di macellazione

10 animali per lotto

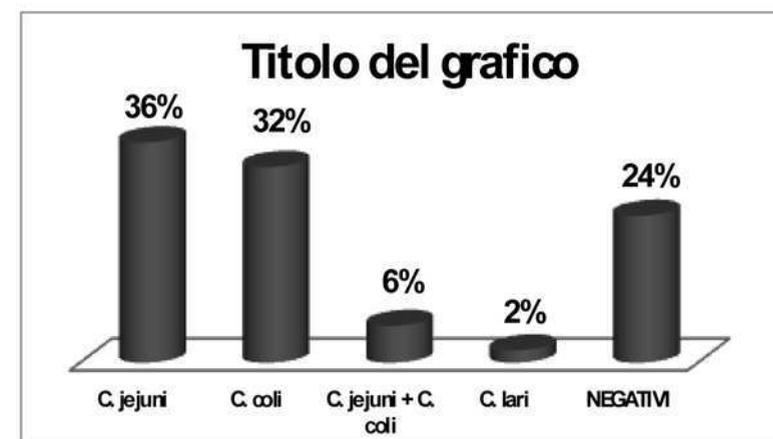
10 campioni di cute, 10 campioni di fegato; 10 campioni di ciechi integri (identificati per soggetto). Su 500 campioni di cute (circa 25 gr prelevati alla base del collo prima dell'eviscerazione), il 34 % è risultato positivo all'isolamento per *Campylobacter*, di cui il 18% per *C. jejuni*, il 14 % per *C. coli* ed il 2% per *C. lari*. Su 500 campioni di fegato, solo il 4% è risultato positivo all'isolamento per *Campylobacter*, di cui il 2% per *C. jejuni* ed il 2% per *C. coli*. Su 500 campioni di ciechi il 74% è risultato positivo per *Campylobacter* di cui il 42% per *C. jejuni* ed il 32% per *C. coli*. Le indagini microbiologiche con semina diretta su terreni mCCD e CBA allestite a partire dalla matrice ciechi (alla base delle tonsille ciecali), hanno dato migliori risultati con un maggior numero di isolati, se confrontati con l'applicazione della ISO 10272-1:2006. Come auspicabile, i dati ottenuti dimostrano un'alta prevalenza di *Campylobacter* a livello ciecale con prevalenza maggiore registrata per *C. jejuni*, quest'ultimo dato risulta essere in leggera controtendenza con gli studi di prevalenza fatti in Italia e nel resto dell'UE nei quali si segnala una prevalenza maggiore per *C. coli*. (Figura 1)

Figura 1: percentuale dei campioni positivi per *C. jejuni*, *C. coli* e *C lari* nelle diverse matrici sottoposte ad indagine microbiologica



I dati analizzati fino ad ora si riferiscono alle singole matrici oggetto dello studio, se si considerano infine i risultati microbiologici ottenuti per lotto di macellazione, il 36% dei lotti è risultato positivo per *C. jejuni*, il 32% per *C. coli*, il 6% per l'associazione *C. jejuni* e *C. coli* ed il 2% per *C. lari*, pari ad una percentuale totale di positività dei lotti analizzati pari del 76%. Quest'ultimo dato è in linea con i valori medi ottenuti negli studi di prevalenza Europei, ma leggermente più alto rispetto allo studio di prevalenza condotto in Italia nel 2008. (Figura 2)

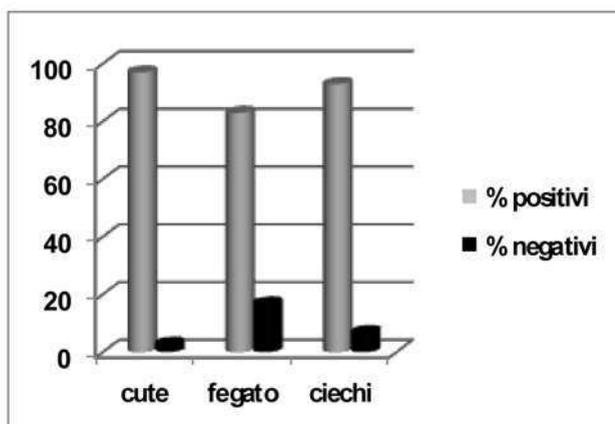
Figura 2: percentuale dei campioni positivi per *C. jejuni*, *C. coli* e *C lari* nei diversi lotti di macellazione



Prove biomolecolari

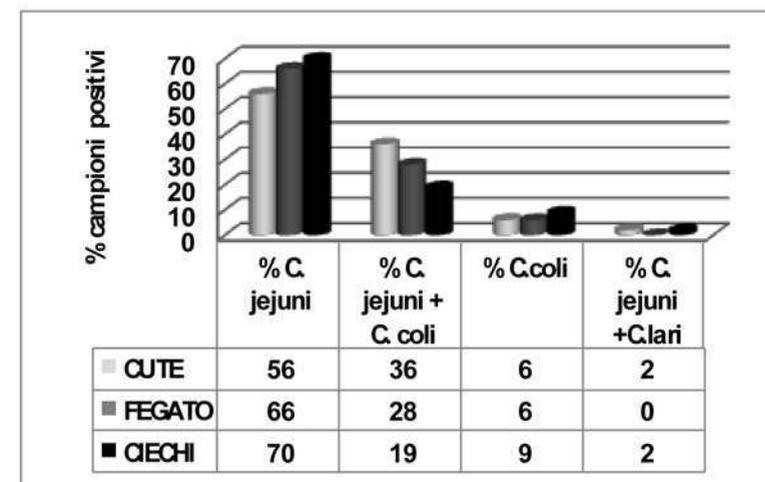
Tutti i campioni, in totale 1500, arricchiti in Bolton broth sono stati sottoposti a PCR Real – Time iQ-ChekK™ *Campylobacter* Kit (Bio-Rad), metodo interno per la ricerca di *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* da matrici alimentari: la cute è risultata positiva per *Campylobacter* termotollerante nel 97% dei casi, il fegato nell'83% ed i ciechi nel 93% dei campioni. Questi dati dimostrano come il genoma batterico sia ampiamente diffuso nelle matrici analizzate; trattandosi di prelievi effettuati in fase di eviscerazione è ipotizzabile una cross contamination, per questo motivo tale dato non può essere considerato nello studio di prevalenza, ma sicuramente non può essere trascurato nella valutazione dei fattori di rischio che intervengono durante il processo di trasformazione delle carcasse al macello fino al prodotto finito. (Figura 3)

Figura 3: percentuale dei campioni positivi alla PCR Real-time iQ-ChekK™ *Campylobacter* Kit (Bio-Rad)



Tutti i campioni positivi alla PCR Real-Time, sono stati sottoposti ad una seconda reazione di PCR Real Time multiplex finalizzata all'identificazione di *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Per i campioni di cute il 56 % è risultato positivo per *C. jejuni*, il 36% per *C. jejuni* associato a *C. coli*, il 6% per *C. coli* ed il 2% per l'associazione *C. jejuni* e *C. lari*. Per i campioni di fegato la maggior percentuale, il 66%, è risultata positiva per *C. jejuni*, il 28% per l'associazione *C. jejuni* e *C. coli* ed il 6% per *C. coli*. I campioni ciecali sono risultati positivi per il 70% per *C. jejuni*, il 19% per *C. jejuni* associato a *C. coli*, il 9% per *C. coli* ed il 2% per l'associazione *C. jejuni* e *C. lari*. I dati ottenuti confermano un'elevata prevalenza di *C. jejuni* su tutti i campioni analizzati. (Figura 4)

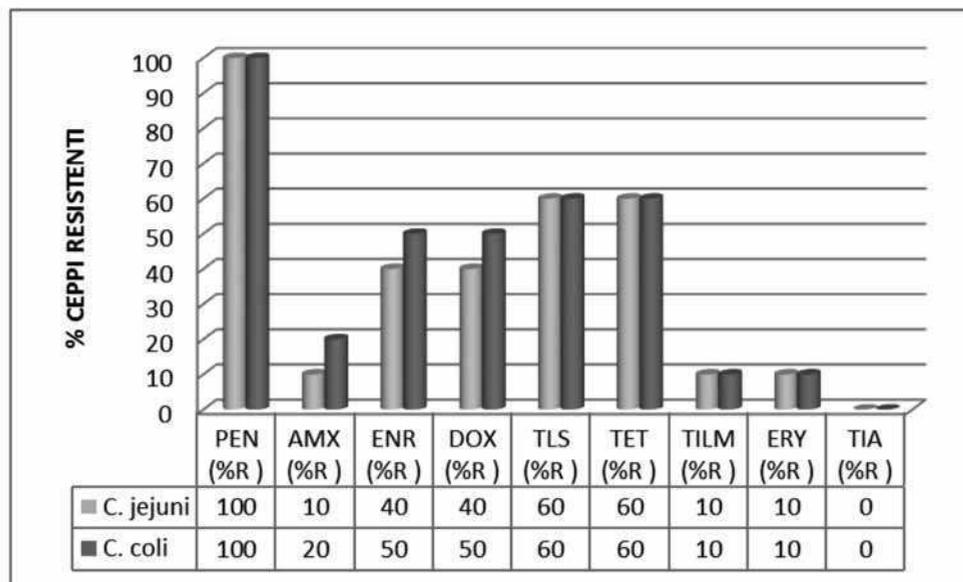
Figura 4: percentuale dei campioni positivi alla PCR Real-time Multiplex



Sensibilità agli antibiotici

Per lo studio di sensibilità agli antibiotici sono stati selezionati ceppi di *Campylobacter* isolati da 20 diversi lotti di macellazione: 10 ceppi di *C. jejuni* e 10 ceppi di *C. coli* (isolati da cute ed intestino cieco). I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato fenomeni di resistenza nei confronti dei 9 antibiotici testati. Rilevante la resistenza agli antibiotici beta-lattamici con resistenza del 100% dei ceppi alla Penicillina e con valori compresi tra 10% e 20% per Amoxicillina; per quanto riguarda la classe dei Fluorochinoloni (Enrofloxacin) la resistenza oscilla tra il 40% e 50%. Per quanto concerne la resistenza alle Tetracicline, i valori sono compresi tra il 40% ed il 60%; la classe dei Macrolidi (Eritromicina, Tilmicosina e Tilosina) ha dato risultati controversi con range di resistenza molto ampi compresi tra il 10% per Eritromicina, Tilmicosina e 60% per Tilosina, quest'ultima molecola, più delle altre, ampiamente impiegata in medicina veterinaria. Nessuna resistenza è stata registrata per la classe delle Pleuromutiline (Tiamulina). Non è stata osservata grande differenza di antibioticoresistenza tra *C. jejuni* e *C. coli*, ma entrambi si sono dimostrati più inclini a sviluppare resistenza verso Fluorochinoloni, Macrolidi e Tetracicline. I ceppi che hanno manifestato maggiore resistenza agli antibiotici sono quelli isolati da novembre a dicembre, non è da escludere che tale fenomeno trovi giustificazione nella maggiore pressione terapeutica in allevamento che gli animali subiscono nel periodo indicato. (Figura 5)

Figura 5: Minima Concentrazione inibente: percentuale di ceppi di *Campylobacter* resistenti



CONCLUSIONI

Lo studio condotto si è posto l'obiettivo di valutare la prevalenza del *Campylobacter* nei broiler regolarmente macellati, di individuare e di aumentare le conoscenze relative all'antibiotico-resistenza del battere isolato nel corso della stessa sperimentazione. Quest'ultimo aspetto nasce dall'esigenza di monitorare uno dei maggiori problemi emergenti di Sanità Pubblica rappresentato dal crescente rischio di resistenza agli antibiotici riscontrato sia in medicina che in agricoltura. Nel settore della medicina veterinaria, l'utilizzo di mangimi medicati, l'adozione di misure chemioterapiche profilattiche di massa, hanno portato ad una progressiva selezione di microrganismi antibiotico-resistenti (EFSA 2012). Diversi studi dimostrano tale resistenza in *Campylobacter* isolati da broiler. I dati EFSA 2011 e 2012 (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), riportano percentuali molto elevate di ceppi batterici resistenti alla Ciprofloxacina (Media UE: 47%) (Nachamkim I. *et al*, 2001), un antimicrobico Fluoroquinolone, d'importanza fondamentale in medicina umana. Non è da escludere quindi come l'uso dei Fluoroquinoloni usati come chemioterapici e per la profilassi in allevamento sia direttamente implicato nello sviluppo della resistenza a questa classe di farmaci antimicrobici da parte del *Campylobacter*. Un'altra classe di farmaci largamente diffusi in medicina veterinaria è rappresentata dai Macrolidi quali Tilosina, Eritromicina e Tilmicosina. I dati EFSA 2011 e 2012 riferiscono percentuali di resistenza comprese tra l'1% (Olanda) e 11% (Belgio) a dimostrazione del fatto che i *Campylobacter* Macrolidi-resistenti sono generalmente più rari rispetto ai ceppi resistenti ai Fluoroquinoloni (Ladely SR *et al*, 2007). Un'altra classe

di farmaci presa in considerazione in funzione dell'ampio spettro e del diffuso impiego, è rappresentata dalle Tetracicline (Ossitetraciclina, Doxiciclina). Sempre i Report EFSA 2011 e 2012 riferiscono per l'UE, percentuali medie di resistenza dal 40% per *C. jejuni* e 46% per *C. coli*. I risultati ottenuti in questa sperimentazione hanno dimostrato una percentuale di resistenza più alta per Tilosina, pari al 60%, rispetto ai dati forniti dai recenti report EFSA. Per gli altri macrolidi (Tilmicosina, Eritromicina), per la classe dei Fluoroquinoloni e delle Tetracicline, i risultati ottenuti nella sperimentazioni sono sovrapponibili a quelli Europei. I ceppi di *Campylobacter* resistenti o multiresistenti possono facilmente raggiungere l'uomo provocando in alcuni casi malattia con la possibilità di compromettere l'efficacia delle terapie antibiotiche mirate al trattamento dell'infezione da parte di questo battere. Lo studio, condotto da diverse matrici (cute, fegato e ciechi) prelevate da 500 carcasse scelte casualmente e provenienti da 50 partite (distribuite su 9 province del territorio nazionale), ha riscontrato un'elevata prevalenza di *Campylobacter* nel pollo da carne. In media il battere è stato rinvenuto nei diversi lotti analizzati nel 76% dei casi con maggiore presenza di *C. jejuni* (36%) seguito da *C. coli* (32%) e *C. lari* (2%). I massimi livelli di contaminazione sono stati riscontrati a livello ciecale (ad indicare un'infezione in allevamento pre-macellazione) e maggiormente rappresentati da *C. jejuni*. I dati ottenuti sono in linea con i dati Europei e descritti dalla bibliografia (Horrock SM *et al*, 2009). Non è stata osservata grande differenza di antibiotico resistenza tra *C. jejuni* e *C. coli*, ma entrambi si sono dimostrati più inclini a sviluppare resistenza verso Fluoroquinoloni, Macrolidi e Tetracicline. I fattori di rischio che intervengono nell'infezione da *Campylobacter* nel broiler e l'individuazione delle nicchie ecologiche che il microrganismo utilizza per la sua sopravvivenza non sono del tutto noti. La riduzione della prevalenza di contaminazione nella carne di pollo può essere ottenuta intervenendo nella fase di produzione primaria e tramite misure sanitarie mirate alla riduzione delle cross-contaminazioni in fase di macellazione e trasformazione. La diminuzione del rischio di Campylobatteriosi umana si concretizza quindi con l'adozione di corrette pratiche di gestione, igiene e biosicurezza per evitare la contaminazione dei prodotti a base di carne cruda negli impianti di trasformazione, ma anche attraverso corrette pratiche igieniche a livello di manipolazione, preparazione e cottura dei cibi. In merito al problema dell'antibiotico-resistenza, partendo dal presupposto che *Campylobacter* resistenti selezionati negli allevamenti, possono facilmente raggiungere l'uomo attraverso l'alimento (Mylius SD *et al*, 2007), appare chiara la necessità di monitorare e approfondire le ricerche su tale fenomeno al fine di sensibilizzare i produttori ad un utilizzo sempre più razionale del farmaco veterinario.

BIBLIOGRAFIA

1. Andrews JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5-16
2. Best EL, Powell EJ, Swift C, Grant KA, Frost JA. (2012). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. 229(2): 237-241.

3. Consiglio dell'Unione Europea (CE) 2003. Regolamento (CE) N. 2160/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti. *Off. J. L325*, 12/12/2003, 1-15.
4. Di Giannatale E, Prencipe V, Colangeli P, Alessiani A, Barco L, Staffolani M, Tagliabue S, Grattarola C, Cerrone A, Costa A, Pisanu M, Santucci U, Iannitto G, Migliorati G. (2010). Prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nel pollo da ingrasso in Italia. *Vet. Ital.* 46(4): 405-414.
5. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(5):3196
6. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(3):3590.
7. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(2):3547.
8. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(4):3129.
9. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Food Microbiol.* 15:18-25.
10. ISO 10272-1:2006: Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* Part I: detection method
11. Ladely SR, Harrison MA, Fedorka-Cray PJ, Berrang ME, Englen MD, Meinersmann RJ. (2007). Development of macrolide-resistant *Campylobacter* in broiler administered subtherapeutic or therapeutic concentration of tylosin. *J. Food Protect.* 70: 1945-1951.
12. Mayr AM, Lick S, Bauer J, Thärigen D, Busch U, Huber I. (2010). Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.* 73(2):241-250.
13. Mylius SD, Nauta MJ, Havelaar AH. (2007). Cross-contamination during food preparation: a mechanistic model applied to chicken-borne *Campylobacter*. *Risk Analysis.* 27(4): 803-813.
14. Nachamkin I, Ung H, Li M. (2002). Increased fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1501-1503.
15. Ricci A, Amato S, Barco L. (2006). Prevalence of *Campylobacter spp.* in broiler chicken farms of Veneto Region. *Rivista di Avicoltura*, 75(6): 15.
16. Rugna G, Meriardi G, Bardasi L, Bassi S, Dell'Anna S, Fontana MC, Galletti G, Massi P, Santi A, Tamba M. (2009). Indagine sulla diffusione di *Campylobacter spp.* nei broiler macellati in Emilia- Romagna. Atti del XIX Convegno Nazionale AIVI, Perugia 24-25-26 giugno, 2009

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENOMICO DEI CEPPI DI VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO (IBDV) ISOLATI NEL POLLO DA CARNE IN ITALIA E IN PAESI ESTERI NEGLI ANNI 2012, 2013 E 2014

Massi P.¹, Fiorentini L.¹, Barbieri I.², Casadio M.¹, Tosi G.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Sezione di Forlì, via Marchini n.1 -forli@izsler.it

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Brescia-

Summary

Viral population dynamics of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) and four non-very virulent IBDV isolated in Italy since 2012 have been analysed and compared to IBDV reference strains. The strains were collected by the intensive farm of five Regions (North, Center and Sud of Italy). The viral population structure of vvIBDV strains showed a strong relationship between geography and phylogeny, with one main group of vvIBDV observed. The low variability and the geographical pattern observed indicate that the virus evolves slowly, occupying the same geographical niche for a long time as for example in Romagna Region. Probably it is depend to the biological features of the virus: being able to remain viable for long periods of time due to a strong environmental resistance, and as an immunosuppressive agent, capable to elude temporally the immune system of the host. About the four nonvvIBDV in commercial broiler, tree of witch in Romagna, is need, for the future, to evaluate their circulation, pathogenicity and the protection offered against them by commercial IBDV vaccines.

In the second part of this study 52 IBDV strains were genetically characterized and compared with reference IBDV strains. Results of the genetic characteristics revealed that the majority of virus (82%) were related to vvIBDV strains. Diagnostic assays that can reliably identify vvIBDV and nonvvIBDV strains are needed for surveillance programs designed to monitor the spread of these viruses.

INTRODUZIONE

La Malattia di Gumboro (IBD) è sostenuta da un virus che appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. E' stata segnalata circa 50 anni fa ed attualmente è considerata essere endemica nella maggior parte dei paesi a produzione avicola e rappresenta una delle maggior cause di perdita economica per l'industria avicola (Van Der Berg et al., 2000). Il virus IBD causa una malattia acuta ed altamente contagiosa per gli animali giovani (Muller et al., 1979). E' un virus privo di *envelope*, a simmetria icosaedrica, con diametro compreso tra 55 e 65 nm. Si conoscono due sierotipi di IBDV: il sierotipo 1, che comprende ceppi classici, varianti e very virulent (vvIBDV) e il sierotipo 2, che raggruppa ceppi apatogeni.

Indipendentemente dal grado di patogenicità del ceppo coinvolto, l'infezione da IBDV si accompagna sempre ad un danno a carico della borsa di Fabrizio, e quindi, ad immunodepressione specialmente negli animali nelle prime tre, quattro settimane di vita. Il genoma virale è costituito da due segmenti di RNA a doppio filamento,