

**RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELL'INFEZIONE  
DA SALMONELLA ENTERITIDIS IN DUE GRUPPI DI GALLINE  
OVAIOLE DI 45 E 65 SETTIMANE DI VITA SOTTOPOSTE A DUE  
DIFFERENTI PROGRAMMI VACCINALI**

Massi P.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Longoni C.<sup>2</sup>, Russo E.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertyni"-Sezione di Forlì-via Marchini 1-Forlì(FC)-forli@izsler.it

<sup>2</sup> MSD Animal Health S.r.l.

**Summary**

The aim of this study was to examine the duration of immunity of different vaccination schemes using a *S. enteritidis* live vaccine and a *S. enteritidis* inactivated vaccine in one group and a *S. enteritidis* live vaccine and a *S. enteritidis*-*S. typhimurium* inactivated vaccine in a second group of layers. Two groups of Lohman Brown chickens were used. Group one (A) was vaccinated two times orally with *S. enteritidis* live vaccine and once i.m. with *S. enteritidis*-*S. typhimurium* inactivated vaccine with an half dose at 14 weeks. Group two (B) was vaccinated two times orally with *S. enteritidis* live vaccine at 3 and 30 days and once i.m. with *S. enteritidis* inactivated vaccine at 14 weeks. Ten layers randomly selected from each of the groups were transferred in laboratory and challenged with a *S. enteritidis* field strain in 45 and 65 weeks of age. In one month we had got an estimation of the impact of challenge on faecal shedding and organ and egg contamination for *Salmonella enteritidis*.

**INTRODUZIONE**

Negli ultimi vent'anni la *Salmonella enterica* subspecie *enterica* sierovariante *enteritidis* è stata la causa maggiore di tossinfezione alimentare batterica umana dovuta al consumo di uova contaminate e di ovoprodotti. Al fine di prevenire l'infezione da *S. enteritidis* nel pollame, e pertanto, minimizzare le infezioni umane, sono state intraprese un certo numero di strategie, come il miglioramento della biosicurezza, la lotta ai roditori, la somministrazione di pre e probiotici, l'utilizzo della vaccinazione. In molti Paesi la vaccinazione delle galline ovaiole è stata implementata di pari passo ai programmi di controllo nazionali per salmonella, tanto che negli ultimi anni in Europa si è registrata una netta riduzione dei casi di infezione umana. Attualmente sono disponibili vaccini vivi attenuati e vaccini inattivati per *S. enteritidis* (Penha et al., 2009).

Diversi sono gli studi che dimostrano una riduzione dell'escrezione fecale da *S. enteritidis* utilizzata per il challenge in animali vaccinati e pochi sono quelli che riportano gli effetti della vaccinazione sulla riduzione della contaminazione dell'uovo ( Okamura et. Al., 2007). Soprattutto pochi sono i lavori che prendono in considerazione l'eliminazione fecale, la contaminazione del guscio, la replicazione negli organi bersaglio (fegato, ovaio e intestino) diverse settimane dopo l'applicazione di schemi vaccinali in varie combinazioni. (Springer et al., 2011)

Per questo motivo sono state eseguite due prove di infezioni sperimentali con un ceppo di campo di *Salmonella enteritidis* su due gruppi di ovaiole con due diversi schemi vaccinali al fine di verificare l'efficacia vaccinale e l'immunità a 45 e 65 settimane di

vita. (Arnold et al., 2014). Gli animali oggetto della prova erano prelevati dallo stesso allevamento, trasferiti nello stabulario della Sezione di Forlì-IZSLER- dove veniva eseguita l'infezione e dove venivano eseguiti accertamenti di laboratorio con lo scopo di verificare l'eliminazione, la colonizzazione e la replicazione del ceppo di *Salmonella enteritidis* usato per il challenge.

**MATERIALI E METODI**

Venivano controllati due gruppi di animali accasati il 15 marzo 2013 per un totale di 34.000 capi allevati in gabbia nello stesso capannone ma vaccinati per *Salmonella* con due schemi vaccinali diversi per *Salmonella*. Per ognuna delle prove venivano utilizzate 10 galline per gruppo selezionate a random. I due gruppi erano identificati come gruppo A e gruppo B e gli schemi vaccinali per salmonella sono riportati come di seguito:

	3 gg	30 gg	14 settimane
Gruppo A	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.inattivato <i>S. enteritidis</i> e <i>typhimurium</i> mezza dose
Gruppo B	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.inattivato <i>S. enteritidis</i>

Le pollastre sono state svezzate in capannoni separati nello stesso allevamento, quindi i gruppi (gruppo A e gruppo B) sono stati mantenuti separati al trasferimento nell'allevamento di deposizione. Al momento del trasferimento in laboratorio gli animali, prima di ogni prova, sono stati sottoposti ad esami batteriologici su tamponi cloacali e ad un controllo sierologico per *S. enteritidis* (Elisa Kit Idexx®), *typhimurium* (Elisa Kit X-OVO Flockscreen™) e *pullorum-gallinarum* (S.A.R. con Ag. *pullorum* IZSLER). Prima dell'introduzione in isolatori le galline sono state sottoposte ad infezione per via orale, con sondino endoesofageo, con un ceppo di campo patogeno di *S. enteritidis* conservato in Biobanca presso la Sezione IZSLER di Forlì con il numero identificativo 229389/2013. Nella prima prova a 45 settimane di vita la dose infettante utilizzata è stata di 10<sup>7</sup> ufc/ml/capo e nella seconda prova a 65 settimane la dose infettante utilizzata è stata di 10<sup>5</sup> ufc/ml/capo. Per entrambe le prove le galline sono state tenute in osservazione per 4 settimane per le lesioni cliniche, sono state controllate con tamponi cloacali ogni 7 giorni, sono state controllate le uova deposte mediante esame batteriologico in pool per giornata di deposizione e a fine prova sono state controllate sierologicamente, quindi sacrificate, sottoposte ad esame anatomopatologico ed al controllo batteriologico sugli organi bersaglio identificati in: intestino, fegato e ovaio. L'esame batteriologico sulle uova è stato eseguito separatamente sul tuorlo e sul guscio. Gli esami batteriologici sono stati eseguiti con metodo ISO 6579/Amd1: 2007.

**RISULTATI**

Nelle due prove di infezione eseguite nessun animale mostrava una sintomatologia clinica apprezzabile. Dal punto di vista anatomopatologico si osservavano soggetti con ovarite fibrinosa ed involuzione ovarica in due soggetti del gruppo A nella prima prova ed involuzione ovarica in tre soggetti del gruppo A e due soggetti del gruppo B nella seconda prova.

I risultati di laboratorio sono riportati come di seguito:

- Esami batteriologici eseguiti su tamponi cloacali nella prima prova

	7gg.post infezione n°positivi/campioni saggiati	14gg.post infezione n°positivi/campioni saggiati	21gg.post infezione n°positivi/campioni saggiati	% positività
Gruppo A	0/10	0/10	1/10	3,33%
Gruppo B	0/10	0/10	0/10	0%

- Esami batteriologici eseguiti su tamponi cloacali nella seconda prova

	7gg.post infezione n°positivi/campi oni saggiati		14gg.post infezione n°positivi/campio ni saggiati		21gg.post infezione n°positivi/campio ni saggiati		28gg.post infezione n°positivi/campio ni saggiati		Positività % media
Gruppo A	6/10	60%	8/10	80%	3/10	30%	3/10	30%	50%
Gruppo B	3/10	30%	1/10	10%	0/10	0%	1/10	10%	12,5%

- Esami batteriologici sulle uova nelle due prove

Le positività batteriologiche sono state riscontrate solo nel guscio

	Prima prova 45 settimane n°positivi/campioni saggiati	% prevalenza della positività	Seconda prova 65settimane n°positivi/campioni saggiati	% prevalenza della positività
Gruppo A	5/23	21,7%	3/23	13%
Gruppo B	2/23	8,69%	0/23	0%

- Esami batteriologici da organi a 28 gg.post infezione (prima prova)

	<b>Fegato</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Ovaio</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Intestino</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività
Gruppo A	7/10	70%	6/10	60%	9/10	90%
Gruppo B	1/10	10%	1/10	10%	1/10	10%

- Esami batteriologici da organi a 28 gg.post infezione (seconda prova)

	<b>Fegato</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Ovaio</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Intestino</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività
Gruppo A	6/10	60%	4/10	40%	2/10	20%
Gruppo B	3/10	30%	1/10	10%	2/10	20%

- Esami sierologici prima prova (45 settimane)

Pre prova	Salmonella sp	Gruppo A		Gruppo B	
	S. pullorum	6/20		20/20	
	S. enteritidis	18/20	90%	13/20	65%
	S. typhimurium	1/20		3/20	
Fine prova					
	S. pullorum	5/10		6/10	
	S. enteritidis	9/10	90%	6/10	60%
	S. typhimurium	2/10		0/0	

- Esami sierologici seconda prova ( 65 settimane)

Pre prova	Salmonella sp	Gruppo A		Gruppo B	
	S. pullorum	10/10		10/10	
	S. enteritidis	10/10	100%	5/10	50%
	S. typhimurium	1/10		4/10	
Fine prova					
	S. pullorum	10/10		10/10	
	S. enteritidis	10/10	100%	9/10	90%
	S. typhimurium	8/10		7/10	

## DISCUSSIONE

Le prove effettuate mettono in evidenza delle caratteristiche di artificiosità in quanto non si conoscono tutte le possibili variabili di campo dei due gruppi compreso l'applicazione dei due schemi vaccinali per salmonella. In entrambe le prove, nonostante l'alto titolo infettante e la distanza temporale dall'applicazione vaccinale e la residua memoria immunitaria da vaccino, i due gruppi non hanno manifestato malattia o sintomi clinici rilevanti, una bassa (gruppo A) o nulla (gruppo B) contaminazione del guscio, una media (gruppo A) o bassa (gruppo B) contaminazione fecale ed infine una media colonizzazione da Salmonella nella prima prova, una bassa colonizzazione nella seconda prova degli organi bersaglio per il gruppo A, mentre si evidenzia una bassa colonizzazione degli organi bersaglio in entrambe le prove per il gruppo B. Dal punto di vista sierologico risultano imprecise le interpretazioni che si possono esplicitare a causa della scarsa specificità dei metodi sierologici utilizzati per Salmonella (Barrow, 1992) e per la notevole capacità di dei diversi sierotipi di Salmonella di sieroconvertire in maniera

crociata. L'unica considerazione utile che scaturisce dai risultati sierologici rilevati è che la sola risposta anticorpale non è sufficiente a proteggere dall'infezione.

In conclusione le due prove sono state fortemente condizionate dal titolo infettante elevato utilizzato nel challenge, dalla lontananza delle vaccinazioni, dagli schemi vaccinali impostati dal Veterinario aziendale che non ha seguito le indicazioni dettate dalle case produttrici dei vaccini utilizzati che hanno visto combinare due dosi di vaccino vivo attentato con una dose di vaccino inattivato in un gruppo e due dosi di vaccino vivo attenuato con mezza dose di vaccino bivalente inattivato nel secondo gruppo. Si ricorda che per il vaccino inattivato utilizzato nel gruppo A la casa produttrice dichiara una protezione immunitaria fino a 56-60 settimane di età con la doppia vaccinazione a dose intera; per il vaccino inattivato utilizzato nel gruppo B la casa produttrice dichiara una protezione soddisfacente fino alla 17 settimana dopo la seconda vaccinazione. In particolare per il gruppo A si deve considerare che il vaccino inattivato bivalente è stato utilizzato a metà dose. Questo significa ridurre ulteriormente la capacità di prolungare nel tempo la risposta immunitaria specifica per *S. enteritidis* proprio come conseguenza di un'applicazione troppo distante da quanto indicato dalla casa produttrice dello stesso vaccino.

#### CONCLUSIONE

In conclusione si può affermare che non esistono molti lavori scientifici che valutano l'efficacia dell'applicazione di diverse combinazioni vaccinali per Salmonella e la loro capacità di prolungare così a lungo la risposta immunitaria specifica, come invece hanno dimostrato le due prove di challenge eseguite con ceppo di campo di *Salmonella enteritidis* con alto titolo infettante ed a così elevata distanza dalle vaccinazioni ed in un caso con l'uso un vaccino inattivato a metà dose.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Arnold ME., Gosling RJ., La Ragione RM., Davies RH., Martelli F. 2014. Avian Pathol. Mar 24.
2. Barrow P.A. 1992. ELISAs and serological analysis of salmonella infections in poultry: a review. Epidemiol. Infect. 109, 361-369.
3. Okamura M., Tachizaki H., Kubo T., Kikuchi S., Suzuki A., Takehara K., Nakamura M. 2007. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. Vaccine 25, 4837-4844.
4. Penha Filho Ra., de Paiva JB., Arguello YM., da Silva MD., Gardin Y., Resende F., Berchieri Junior AB., Sesti L., 2009. Avian Pathol. 38(5):367-75.
5. Springer S., Lindner T., Ahrens M., Woitow G., Prandini F., Selbitz HJ. 2011. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 124(3-4):89-93.

#### CIRCOLAZIONE DI UN NUOVO GENOTIPO DI VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA

Moreno A.<sup>1</sup>, Ceruti R.<sup>2</sup>, Boniotti B.<sup>1</sup>, Gavazzi L.<sup>2</sup>, Fasoli P.<sup>3</sup>, Cordioli P.<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, via Bianchi, 9 – 25124, Brescia
- <sup>2</sup> Gesco Consorzio Coop., Via Bonfandina, 9 – Cazzago San Martino, Brescia
- <sup>3</sup> Avicola Alimentare Monteverde SRL, Via San donato, 107 – Rovato, Brescia

#### Summary

This study reported for the first time the circulation in Italy since 2012 of IBV strains closely related to IBV/Guandong/Xindadi/0903 isolated in China. The description of clinical forms, virus isolation, sequencing of S1 gene and phylogenetic and molecular analysis of four cases detected in the period 2012 - 2014 were here described. The phylogenetic analysis showed that the Italian and Chinese strains formed a clearly distinguishable group within the A2 genotype, which included the QX strain widely isolated in Europe and China. The major part of strains belonging to this genotype were nephropathogenic, however the group here described was associated with respiratory forms without renal involvement. The full-length S1 gene of two Italian strains was sequenced and along with other full-length IBV genomes available from GenBank, IBV/Guandong/Xindadi/0903 included, was analyzed for recombination. Evidence of recombination was found in the Italian and Chinese strains in the S1 protein being identified the QX and 4/91 sequences as major and minor parents. These results demonstrated the circulation of a new IBV variant closely related to IBV strains isolated in China probably originated as result of a recombination event between QX and 4/91 strains. Permanent monitoring of circulating strains would be advisable in order to rationally modify vaccination strategies to make them appropriate to the field situation.

#### INTRODUZIONE

La bronchite infettiva aviare, patologia a diffusione mondiale, causa ogni anno notevoli problemi sia sanitari che economici per il settore avicolo italiano. Le perdite economiche sono in parte dovute alla notevole variabilità antigenica dei ceppi virali coinvolti che, malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti con il ceppo classico M41 e con il ceppo 4/91 (793B), continuano a determinare la comparsa di forme cliniche. Anche il tropismo virale diviene sempre più variabile e si manifesta con differenti forme cliniche, dalle respiratorie o renali più frequenti nei broilers a quelle caratterizzate da calo di ovodeposizione ed alterazione della qualità del guscio tipiche di ovaiole e riproduttori. A partire del 1956 (3), si sono progressivamente identificati nuovi sierotipi o varianti di virus della bronchite infettiva aviare (IBV) nei vari continenti, isolati anche da polli vaccinati con il ceppo classico Massachusetts. A tutt'oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi e, tuttavia, si pensa che solo una piccola parte di quelli esistenti sia stata individuata. L'elevata variabilità del virus, classificato come gamma coronavirus, sarebbe riconducibile fondamentalmente