

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI IMMUNOISTOCHEMICA PER RIEMERELLA ANATIPESTIFER A FINI DIAGNOSTICI

Zanardello C.¹, Bano L.², Drigo I.², Bonfante F.³, Gobbo F.³, Zandonà L.², Vascellari M.¹

¹ *Diagnostica specialistica e istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD);*

² *Sezione Diagnostica di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4 int. 5/6, 31020 Fontane di Villorba (TV);*

³ *Virologia speciale e sperimentazione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD).*

Summary

Riemerella anatipestifer (RA) is a rod-shape, non-spore forming, non-motile, gram-negative pathogen that infects many species of birds, especially goose, ducks and turkeys. Chickens, pheasant and wild birds can also be affected. RA occurs as an acute or chronic infection characterized by a severe polyserositis with fibrinous pericarditis, perihepatitis, airsacculitis and meningitis. RA is a worldwide pathogen that causes important economic damages in poultry industry due to the high mortality rate and the costs linked to antimicrobial treatments. The presence of 21 serotypes of RA represents an issue both for the diagnosis and the control of the disease. The diagnostic tools actually available not always permit to give a reliable and quick diagnosis.

In order to investigate the disease caused by RA, we developed an antibody to be used for immunohistochemistry (IHC) and validated an IHC protocol to detect RA antigens in tissue sections.

For the experimental protocol, ten 1-day-old turkeys, declared not vaccinated for RA, were intravenously (IV) infected with RA serotype 1, which results the most common serotype responsible for recurrent outbreaks of the disease in Italian poultry flocks. Five days post-infection, the animals were euthanized. All the subjects underwent to gross examination during which swabs were performed from the air sacs and joints and submitted in pools for PCR. From all animals, samples of the pericardium, lung, liver, spleen, brain and joints were collected and routinely processed for histopathology and IHC. The IHC was performed using the automatic immunostainer BenchMark Ultra (Ventana, Roche). The slides were incubated with the polyclonal anti-*Riemerella* serotype 1 antibody, produced in rabbits, at a dilution of 1:2000 for 32 minutes at room temperature. Tissue sections from naturally infected animals (positive control) and from three Specific Pathogen Free (SPF) turkeys, not infected (negative control), were included in each run. Histologically all the subjects showed multifocal to diffuse heterophilic infiltration with fibrinous exudation in meninges, synovial membranes, pericardium and splenic serosa. The liver and lung samples showed diffuse oedema and vascular congestion with the presence of intravascular fibrinous thrombi. IHC positivity was revealed in the fibrinous heterophilic exudate in the spleen of all the subjects, in the 8/10 pericardium, 8/10 lungs, 5/10 liver, 9/10 meninges and 9/10 synovial membranes. All the tissues from uninfected animals (negative con-

trol) were IHC negative.

The results obtained in this study suggest that the correlation between IHC, clinical signs and anatomo-histopathological lesions permits to quickly confirm the presence of RA in the farm allowing the vet to undertake the most appropriate treatment for the animals.

INTRODUZIONE

Riemerella anatipestifer (RA) è un batterio bastoncellare, non sporigeno, immobile, Gram negativo patogeno primario per molte specie avicole, nelle quali causa infezioni sia acute sia croniche con pesanti conseguenze per il settore avicolo (Ruiz and Sandhu, 2013), dovute agli elevati tassi di mortalità, scarti alla macellazione, riduzione dell'indice di conversione alimentare e costi legati all'utilizzo di antimicrobici per contenere la malattia.

L'agente eziologico RA causa polisierositi fibrino-eterofiliche in diverse specie di avicoli in particolar modo anatre, oche e tacchini (Sandhu, 2003), ma è stato segnalato anche in altre specie di uccelli quali polli, fagiani e volatili selvatici (Wobeser and Ward, 1974). Gli animali giovani sono più vulnerabili, con differenze legate alla specie, e la malattia si riscontra in generale entro le 10 settimane d'età. La trasmissione di RA sembra avvenire principalmente per via aerogena e tramite ferite cutanee; tuttavia carenze nutrizionali, stress, condizioni climatiche avverse e patologie concomitanti (Rubbenstroth et al., 2009) potrebbero rappresentare fattori predisponenti, soprattutto in soggetti molto giovani (Chang et al., 2019).

Le lesioni anatomopatologiche, sovrapponibili in tutte le specie colpite, consistono principalmente in perisplenite, periepatite, aerosacculite, artrosinovite e meningite fibrinosa (Gyuris et al., 2018).

Gli strumenti attualmente disponibili per la prevenzione ed il contenimento della malattia sono l'immunizzazione degli animali tramite vaccinazione, le buone pratiche d'allevamento e l'utilizzo corretto di antimicrobici. La presenza di almeno 21 sierotipi di RA (Ruiz & Sandhu, 2013), l'elevata variabilità antigenica degli stessi e la scarsa cross-protezione del vaccino, rendono tuttavia quest'ultimo poco applicabile nella pratica quotidiana a meno che non si sia sierotipizzato il ceppo circolante. Elevate misure di biosicurezza e il corretto utilizzo di antimicrobici diventano quindi indispensabili per prevenire e controllare la malattia. In presenza di malattia in allevamento, l'isolamento e l'identificazione di RA risultano cruciali per una corretta diagnosi, sebbene studi precedenti abbiano evidenziato alcuni limiti identificativi delle metodiche di laboratorio attualmente in uso, dovuti alla vicinanza filogenetica con specie microbiche dello stesso genere o di generi affini (Hess et al., 2013), ipotizzando anche un legame con la fase di infezione (Pickrell, 1996).

Dal punto di vista anatomopatologico RA causa lesioni anatomopatologiche molto caratteristiche, ma non patognomoniche, che devono essere poste in diagnosi differenziale con altri batteri che possono causare quadri patologici simili. Diagnosi differenziali includono colibacillosi, salmonellosi, pasteurellosi e streptococchi (Chikuba et al., 2016).

Ad oggi non esistono in commercio anticorpi utilizzabili in immunistochimica (IHC) che consentano di identificare RA nel contesto delle lesioni anatomopatologiche.

Lo scopo di questo lavoro è stato mettere a punto un protocollo di IHC che possa affiancare la valutazione anatomopatologica delle lesioni in animali sintomatici. Questo lavoro è parte di uno studio più ampio (Progetto di Ricerca Corrente IZS VE 14/16) che ha preso in esame diversi aspetti dell'infezione da RA attraverso diverse fasi progettuali.

MATERIALI E METODI

Fase sperimentale

Dieci tacchini ibridi Aviagen di 1 giorno, figli di riproduttori dichiarati non vaccinati per RA, sono stati stabulati in isolatori a ventilazione forzata attraverso filtri HEPA, contenenti ciascuno 5 soggetti. Da ciascun soggetto è stato effettuato un tampone tracheale da sottoporre a PCR per RA sia all'arrivo che all'età di 14, 41 e 54 giorni. Al 54° giorno di vita, gli animali sono stati infettati per via endovenosa (EV) con un ceppo di RA di campo sierotipo 1 ST 46, che risulta epidemico negli allevamenti di tacchini da carne italiani (Bano et al., 2020). Il titolo degli inoculi batterici utilizzati per l'infezione era pari a 10^9 UFC/mL, ottenuto su 1 ml di soluzione fisiologica. Dopo l'infezione gli animali sono stati monitorati per 5 giorni e sono stati registrati eventuali sintomi clinici/mortalità. Al quinto giorno post infezione gli animali ancora in vita sono stati soppressi. Al termine della prova tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame anatomo-patologico nel corso del quale sono stati eseguiti tamponi dai sacchi aerei e dalle articolazioni tibio-tarso-metatarsali, da sottoporre, in pool per gruppo sperimentale, a ricerca RA tramite PCR.

Indagini istopatologiche ed immunoistochimiche (IHC)

Da tutti i soggetti sono stati prelevati campioni di pericardio, polmone, fegato, milza, cervello e articolazioni da sottoporre ad indagine istopatologica. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata 10% per un tempo compreso tra 24 e 72 ore, routinariamente processati e inclusi in paraffina. Sezioni di tessuto di 3 μ m sono state colorate in ematossilina eosina e valutate istologicamente.

Su sezioni di tessuto di 4 μ m è stata condotta l'indagine immunoistochimica utilizzando l'immunocoloratore automatico

BenchMark Ultra (Ventana, Roche). Per lo smascheramento antigenico è stato utilizzato benchmarck ULTRA Cell Conditioning Solution CC2 pH 6.0 a 91°C per 24 minuti; successivamente i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo policlonale anti -Riemerella sierotipo 1 prodotto in coniglio [applicando protocolli consolidati disponibili in letteratura (Bisgaard M., 1982). La produzione è avvenuta sulla base dell'autorizzazione n° 124/2019-PR del 12/2/2019 rilasciata dal Ministero della Sanità, Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari], alla diluizione di 1:2000 per 32 minuti a temperatura ambiente. Come sistema di rivelazione e cromogeno è stato utilizzato l'UltraView Universal DAB detection Kit, della ditta Roche (cod. 052697806001). Come contro-colorazione è stata usata Ematossilina per 8 minuti.

In ogni corsa sono state inserite sezioni di tessuto da animale con infezione naturale da RA confermata (controllo positivo) e sezioni di tessuto di tre tacchini Specific Pathogen Free (SPF), non infettati (controllo negativo).

RISULTATI

I tamponi tracheali di tutti i soggetti sono risultati negativi alla PCR per RA indipendentemente dal giorno del campionamento. La PCR eseguita sui pools di tamponi eseguiti dai sacchi aerei e dalle articolazioni prelevati in sede autoptica, è risultata positiva.

Dopo 24 ore dall'inoculazione EV, tutti i soggetti presentavano debolezza, abbattimento, riluttanza al movimento e diarrea.

A 48 ore dall'infezione, oltre ai sintomi precedentemente descritti, due animali dello stesso isolatore manifestavano incoordinazione e tumefazione dell'articolazione tibio-tarso-metatarsale sx, rispettivamente; nell'altro isolatore un solo soggetto manifestava incoordinazione e depressione del sensorio.

A 72 ore post infezione un soggetto presentava atteggiamento a "cane seduto" con arti inferiori distesi in avanti.

All'esame autoptico tutti i soggetti presentavano artrosinoviti fibrino-eterofiliche bilaterali delle articolazioni tibio-tarsiche, epato- e splenomegalia (eccetto due soggetti), pericardite fibrinosa, opacizzazione dei sacchi aerei talvolta con iniziale essudazione fibrinosa, sinusite e tracheite catarrale. Non sono state osservate lesioni macroscopiche a carico degli altri organi.

L'indagine istopatologica ha evidenziato in tutti i soggetti, da multifocale a diffusa infiltrazione eterofilica con essudazione fibrinosa e presenza di più rari macrofagi, a carico di meningi, membrane sinoviali, pericardio e sierosa splenica. I campioni di fegato e polmone presentavano diffuso edema e congestione vasale con presenza di trombi fibrinosi endovasali. L'indagine IHC ha evidenziato immunopositività a carico dei focolai di flogosi fibrino eterofilica nella milza (10/10 soggetti), cuore e pericardio (8/10 soggetti), polmone (8/10 soggetti), fegato (5/10 soggetti), meningi (9/10 soggetti) e membrane sinoviali (9/10 soggetti). Tutti i campioni di controllo negativo (tessuti da animali non infettati) sono risultati negativi all'indagine IHC.

DISCUSSIONE

RA è un patogeno diffuso a livello mondiale che anche in Italia ha dato origine ad epidemie che ad ondate hanno causato importanti perdite economiche per il settore avicolo legate sia ai danni zootecnici sia all'impiego di farmaci per contenere la patologia. Nell'ultimo decennio si è assistito a ondate epidemiche che hanno avuto il loro apice nel 2015, anno in cui si è ricorso anche all'utilizzo di vaccini stabulogeni per l'immunizzazione massiva degli animali. L'efficacia della vaccinazione dipende, oltre che dal protocollo utilizzato, anche dalla conoscenza del sierotipo circolante in quel momento nell'allevamento. La sierotipizzazione di conseguenza pur rimanendo strumento fondamentale ed indispensabile per lo sviluppo di vaccini necessari alla lotta alla malattia, deve poter essere affiancata da metodiche diagnostiche sensibili e rapide, di facile utilizzo nella pratica quotidiana, e che non risentano di eventuali trattamenti antimicrobici somministrati agli animali.

La polisierosite fibrino eterofilica causata da RA, pur essendo fortemente indicativa di malattia, non può essere considerata comunque patognomonica e devono essere considerate in diagnosi differenziale altre cause batteriche.

La messa a punto di un protocollo di IHC ha consentito, negli animali oggetto di

sperimentazione, di evidenziare la presenza del patogeno nelle lesioni riscontrate, attraverso una forte risposta immuno-cromogenica all'anticorpo utilizzato.

In questo lavoro, la positività all'IHC è stata riscontrata infatti nella maggioranza dei soggetti infettati negli organi ritenuti *target* come dimostrato da studi precedenti (milza, sinovia, meningi, pericardio, polmoni e fegato).

I polmoni ed il fegato, pur non presentando lesioni istopatologicamente significative, hanno evidenziato una buona (8/10 e 5/10 rispettivamente) positività immunostochimica a carico dei trombi vasali.

Considerati i diversi distretti anatomici interessati dall'infezione da RA e la scarsa efficacia, in particolare per alcune localizzazioni, dei farmaci antibatterici maggiormente in uso negli avicoli, la profilassi vaccinale è da preferire sicuramente ad un approccio terapeutico. Tuttavia elevate misure di biosicurezza e l'utilizzo di antimicrobici risultano indispensabili nelle prime fasi della malattia, per contenerne la diffusione.

Gli ottimi risultati ottenuti dalla prova sperimentale consentono di poter affermare che l'IHC può essere ritenuta una metodica sensibile, poco costosa e di più rapida esecuzione rispetto ad esempio all'esame colturale che, peraltro, può anche risentire negativamente di eventuali trattamenti antimicrobici. Inoltre, rispetto alla PCR, l'IHC consente di localizzare la presenza del patogeno nelle lesioni istopatologiche, non limitandosi solo alla presenza del materiale genetico.

CONCLUSIONE

Il protocollo IHC messo a punto in questo studio consente quindi la correlazione tra sintomatologia clinica, lesioni anatomo-istopatologiche e IHC, permettendo in tempi rapidi di confermare la presenza di RA, sierotipo 1, in allevamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Ruiz J.A. & Sandhu T. (2013). *Riemerella anatipestifer* infection. Disease of Poultry, 13th ed. (Swayne, D. E. ed.) Wiley Blackwell publishing, Ames, pp. 823-828.
2. Sandhu T.S. (2003). *Riemerella anatipestifer* infection. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Gilsson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), Diseases of Poultry 11th edn. pp. 676682.
3. Wobeser G. & Ward G.E. (1974). *Pasteurella anatipestifer* infection in migrating whistling swans. Journal of Wildlife Diseases, 10, 466470.
4. Rubbenstroth D., Ryll M., Behr K.P. & Rautenschlein S. (2009). Pathogenesis of *Riemerella anatipestifer* in turkeys after experimental mono-infection via respiratory routes or dual infection together with the avian metapneumovirus. Avian Pathology, 38:6, 497-507.
5. Chang F.F., Chen C.C., Wang S.H. & Chen C.L. (2019). Epidemiology and antibiogram of *Riemerella anatipestifer* isolated from waterfowl slaughterhouses in Taiwan. J Vet Res 63.
6. Gyuris E., Nemes C. & Magyar T. (2018). Data on the epidemiology and pathology of *anatipestifer* disease in Hungary (2010-2014). Acta Vet Hung 66(3):350-364.
7. Hess C., Enichlmayr H., Jandreski-Cvetkovic D., Liebhart D., Bilic I. & Hess M. (2013). *Riemerella anatipestifer* outbreaks in commercial goose flocks and

- identification of isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *Avian Pathology* 42(2):151-6.
8. Pickrell J.A. (1966). Pathologic changes associated with experimental *Pasteurella anatipestifer* infection in ducklings. *Avian Disease* 10: 281-288.
 9. Chikuba T., Uehara H., Fumikura S., Takahashi K., Suzuki Y., Hoshinoo K. & Yamamoto Y. (2016). *Riemerella anatipestifer* infection in domestic ducks in Japan, 2014. *J Vet Med Sci* 78(10): 1635-1638.
 10. Bano L., Cornaggia M., Di Castri A., Zandonà L., Rizzardi A., Zarpellon G., Guolo A., Ferro T., Moschioni C., Tonon E., Bacchin C., Ceruti R., Giovanardi D., Catania S. & Drigo I. (2020). Caratterizzazioni genotipiche e fenotipiche di ceppi di *Riemerella anatipestifer* isolati dal pollame in Italia. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria*, pp. 45-51.
 11. Bisgaard M., (1982). Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination. *Avian Pathology* 11:341-350