

RILIEVI CLINICI, ANATOMOPATOLOGICI E DIAGNOSTICI RACCOLTI NEL CORSO DELLA MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELLA RIEMERELLOSI NEL TACCHINO DA CARNE

Zandonà L.¹, Rizzardi A.¹, Guolo A.¹, Tonon E.¹, Drigo I.¹, Gobbo F.², Bonfante F.², Terregino C.², Bano L.¹

¹ Sezione Diagnostica di Treviso, IZS delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020 Fontane di Villorba, Treviso;

² Virologia Speciale e Sperimentazione, IZS delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro, Padova.

Summary

In order to investigate the protective effects of vaccines to prevent riemerellosis in turkeys, a reliable experimental model for the reproduction of the disease is needed. In the present study, we tried to reproduce the clinical signs and lesions through different infection routes: intramuscular (IM), ocular conjunctival (OC) and intravenous (IV). A field strain of *Riemerella anatipestifer* (RA) serotype 1, sequence type (ST) 46, considered epidemic in Italian meat-turkey flocks, was used for the inoculation preparations. The IM and OC routes failed to produce signs or macroscopic lesions, and attempts to reisolate the organism were unsuccessful. However, RA was detected by PCR in tracheal swabs collected at the end of the trial from birds inoculated via the OC but not via IM route. Typical clinical signs and lesions were seen only in the turkeys given intravenously inoculation at 57 days of age.

Serological investigations performed through an indirect ELISA developed *in house* showed that anti-RA antibodies increased in one week post-infection in both OC and IM groups, but in the latter, the antibody titre decreased more quickly than for OC group. This observation could be due to the prolonged persistence of RA in the upper respiratory tracts of birds given OC inoculation.

In conclusion, we were able to set up an experimental model for the reproduction of the typical clinical signs and lesions riemerellosis in turkeys via the IV route. The developed ELISA test might be applied in the future to study the immune response to vaccines and to evaluate the formation of turkey flocks RA-free.

INTRODUZIONE

Riemerella anatipestifer (RA) (ex *Pasteurella anatipestifer*), è un cocco-bacillo Gram-negativo, immobile, catalasi e ossidasi positivo, appartenente alla famiglia delle *Flavobacteriaceae*.

La prima segnalazione di tale microrganismo risale all'inizio del secolo scorso, associata a una grave polisierosite degli anatidi (Riemer, 1904). Oggi la malattia è da considerarsi cosmopolita ed esistono moltissime segnalazioni in diverse specie di pollame allevato, sebbene queste provengano principalmente dal continente asiatico e riguardino gli anatidi.

In Italia la malattia è stata descritta per la prima volta nel 1979 in tacchini da carne di 70 giorni, e in polli da carne di 40-50 giorni (Pascucci et al., 1981). La sintoma-

tologia nel tacchino era caratterizzata da paralisi delle ali e delle gambe, opistotono, torcicollo, ribaltamento, cecità e mortalità del 20%. Nel pollo la sintomatologia era inizialmente respiratoria, subito seguita da forma neurologica caratterizzata da tremori del capo, incoordinazione e tassi di mortalità compresi tra il 3% e il 5%. Successivamente sono stati osservati anche quadri di zoppia dovuti a localizzazione articolare del patogeno e conseguente artrite (Giovannetti & Pascucci, 1983).

Nell'ultimo decennio si è assistito a ondate epidemiche di riemerellosi nel comparto del tacchino da carne di difficile spiegazione, che hanno avuto il loro apice nel 2015, anno in cui si è ricorso anche a immunizzazione massiva dei gruppi con vaccini stabulogeni.

Tali ondate hanno coinciso con l'introduzione nel nostro paese di un ceppo epidemico appartenente al sierotipo 1 e al sequence type (ST) 46, che negli ultimi anni ha sostituito completamente i ceppi precedentemente circolanti nel comparto del tacchino da carne (Bano et al., 2020).

Purtroppo la messa a punto di presidi immunizzanti efficaci nel contrastare la malattia è complicata dalla mancanza di un modello di riproduzione sperimentale nel tacchino. Con il presente studio si è voluto proprio studiare un modello di riproduzione sperimentale della riemerellosi in tacchini da carne infettati attraverso varie vie d'inoculazione. Nel corso della sperimentazione è stato possibile mettere a punto alcuni strumenti diagnostici che potranno risultare utili nell'applicazione di nuove strategie finalizzate al contenimento della riemerellosi in allevamento.

Questo lavoro è parte di uno studio più ampio (Progetto di Ricerca Corrente IZS VE 14/16) dal titolo "Potenziamento delle strategie di prevenzione e controllo della riemerellosi del pollame attraverso caratterizzazioni fenotipiche e genotipiche dei ceppi circolanti in Italia".

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

La sperimentazione animale di seguito descritta è avvenuta sulla base dell'autorizzazione n° 115/2014-PR del 19/12/2014 rilasciata dal Min. della Sanità, Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari.

Cinquanta tacchini da carne commerciali femmina B. U. T. 6 (Aviagen) provenienti da riproduttori non vaccinati per riemerellosi, a un giorno di vita sono stati stabulati a gruppi di 5 in isolatori a ventilazione forzata attraverso filtri HEPA. Gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali: il primo era costituito da 20 soggetti infettati per via intramuscolare (gruppo IM), il secondo da 20 soggetti sottoposti ad infezione per via oculo-congiuntivale (gruppo OC), mentre il terzo era il gruppo "controllo" (gruppo "C") costituito da 10 soggetti non sottoposti ad alcuna infezione.

L'infezione sperimentale è avvenuta a 34 giorni impiegando un ceppo di campo appartenente al sierotipo "1" ST 46, che risulta epidemico negli allevamenti di tacchini da carne italiani (Bano et al., 2020).

Nel gruppo "IM" l'infezione è avvenuta somministrando nel muscolo pettorale 1 mL di soluzione batterica con concentrazione pari a 10^9 UFC/mL, ottenuta in soluzione fisiologica (Smith et al., 1987). Nel gruppo OC sono stati somministrati 0,1 mL nel sacco lacrimale di un occhio e 0,1 in quello dell'occhio controlaterale, di una soluzione batterica con titolo analogo a quello descritto per il gruppo "IM". Ai soggetti

del gruppo controllo è stata somministrata soluzione fisiologica sterile sia per via intramuscolare che oculo-congiuntivale, con le stesse modalità descritte per i gruppi infettati sperimentalmente.

I soggetti sono stati monitorati dal punto di vista clinico quotidianamente sino al termine della sperimentazione conclusasi il 56° giorno di vita per i gruppi OC e IM. Il giorno seguente a tale data, il gruppo controllo composto da 10 soggetti, è stato infettato per via endovenosa con inoculi allestiti allo stesso modo di quelli impiegati per l'infezione IM.

Campionamento

All'arrivo e nei giorni 14, 41 e 54 sono stati eseguiti tamponi tracheali da tutti i soggetti e processati in pool da 5 per la presenza di RA attraverso PCR (Christensen & Bisgaard, 2010). Il giorno dell'arrivo, prima della suddivisione in gruppi sperimentali, è stato eseguito un prelievo di sangue da 5 soggetti. Un prelievo di sangue è stato eseguito anche nei giorni 14, 32, 40, 47 e 54 da tutti i soggetti dei gruppi sperimentali. Il siero ottenuto è stato sottoposto alla ricerca di anticorpi prodotti nei confronti di RA mediante un metodo ELISA sviluppato *in house*, come descritto di seguito.

Gli animali dei gruppi OC e IM sono stati sacrificati il giorno 56 mentre il gruppo EV è stato soppresso dopo 5 giorni dall'infezione (62 gg). Tutti gli animali sono stati sottoposti ad esame anatomo-patologico nel corso del quale sono stati eseguiti tamponi dai sacchi aerei e dalle articolazioni da sottoporre a ricerca RA tramite PCR. In sede autoptica sono stati condotti accertamenti batteriologici da sacco aereo, cervello, polmone, fegato, milza e articolazione tibio-tarso-metatarsale. Porzioni di organi sono stati fissate in formalina tamponata 10% per la valutazione istopatologica e per lo sviluppo di un test in immunoistochimica per la rilevazione di RA i cui risultati saranno oggetto di altra comunicazione.

Accertamenti batteriologici

L'esame è stato eseguito inoculando con i campioni prelevati asepticamente piastre di agar sangue (AS) e brain heart infusion broth (BHI). I terreni sono stati incubati tutti a 35 ± 2 °C in condizioni di microaerofilia. Le piastre di AS sono state ispezionate a 24 e 48 ore e, in caso di negatività, dopo 24 ore si è proceduto all'esecuzione dell'esame batteriologico indiretto a partire da BHI. A tale fine, i BHI sono stati seminati su nuove piastre di agar sangue utilizzando tamponi cotonati sterili e le piastre sono state incubate a 35 ± 2 °C in condizione di microaerofilia e ispezionate dopo 24 e 48 ore. In caso di crescita le colture sono state identificate mediante MALDI TOF MS (Bruker, Daltonics).

Sierologia

Per la rilevazione di anticorpi anti-RA è stato sviluppato un test ELISA indiretto *in house*. L'antigene era costituito da un estratto dei lipopolisaccaridi (LPS) di una coltura di RA sierotipo "1" ST 46, ottenuta in apparato da dialisi impiegando una membrana con cut-off di 15 kDa immersa in 800 mL di Veal Broth, mantenuto in agitazione mediante magnete. Dopo 24 ore la brodocoltura è stata raccolta e sottoposta ad estrazione dei lipopolisaccaridi come descritto in letteratura (Eugene e Hackett, 2000).

Le concentrazioni di antigene (lipopolisaccaride), siero da analizzare e coniugato

descritte di seguito, sono state scelte sulla base di classiche prove di ottimizzazione dei reagenti di un test ELISA indiretto (Crowter, 2009).

Piastre Maxisorp NUNC-immunoplate (Nunc) sono state incubate con 100 μ L/pozzetto per 1,5 ore a 37 °C impiegando una concentrazione di antigene pari a 1:600, diluito in tampone carbonato 0,05 M a pH 9,6. Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate 3 volte con 300 μ L/pozzetto di PBS addizionato con lo 0,05% di Tween 20 (PBS-T). I siti aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione per 1 ora a 37 °C con 200 μ L/pozzetto di una soluzione di bloccaggio (BB) costituita da PBS-T addizionato con 5% di latte in polvere (Sigma Aldrich) e di EDTA 0,5 mM. Le piastre sono state nuovamente lavate ed incubate per 1h a 37 °C con 100 μ L dei sieri in esame diluiti 1:100 in PBS-T addizionato con l'1% di BSA e con 0,5 mM di EDTA (Dilution Buffer, DB). I controlli positivi erano costituiti da sieri di tacchini vaccinati 2 volte con vaccino commerciale (sierotipo "1") mentre come controlli negativi sono stati impiegati sieri di soggetti non vaccinati e che non hanno sperimentato la malattia. Dopo incubazione le piastre sono state ulteriormente lavate come sopra descritto ed incubate per 1 ora a 37 °C con l'anticorpo Anti-Turkey IgY associato a perossidasi (Abcam), diluito 1:800. Al termine dell'incubazione dopo 3 lavaggi con 300 μ L/pozzetto di PBS-T sono stati aggiunti 100 μ L di 1-StepTM ABTS (Thermo Scientific). Dopo 30 minuti di incubazione in leggera agitazione la reazione è stata stoppata aggiungendo 100 μ L di una soluzione all'1% di SDS (sodio-dodecil solfato) e la lettura è stata eseguita impiegando uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati ottenuti sono stati normalizzati rispetto ai controlli ed espressi in valore S/P (Sample to Positive Ratio) che corrisponde al valore della densità ottica del campione considerato in rapporto ai valori degli standard positivo e negativo inseriti nella piastra ed espresso in percentuale.

RISULTATI

Nel corso della sperimentazione gli unici segni clinici osservati nei gruppi OC e IM sono stati a carico dell'apparato locomotore ed erano caratterizzati da sporadiche zoppie intermittenti di grado variabile, indipendentemente dalla via d'infezione, mentre nel gruppo controllo non è stata segnalata alcuna sintomatologia. Due giorni dopo l'infezione per via EV, tutti i soggetti manifestavano debolezza degli arti inferiori, riluttanza al movimento e diarrea. Il terzo giorno, 3/10 soggetti si presentavano in decubito laterale con grave depressione del sensorio mentre un quarto soggetto mostrava incoordinazione e tumefazione dell'articolazione tibio-tarso-metatarsale. Il quinto giorno (62 gg.) tutti i soggetti, ad eccezione di 2, manifestavano sintomatologia neurologica caratterizzata da depressione del sensorio, assenza di risposta agli stimoli o stato comatoso e per tale ragione si decideva di sacrificare tutti i soggetti del gruppo.

All'esame anatomo-patologico eseguito al termine della prova non sono state osservate lesioni macroscopicamente evidenti in alcuno dei soggetti appartenenti ai gruppi OC e IM, mentre nel gruppo infettato per via EV erano presenti artro-sinoviti fibrino-eterofile bilaterali, epato-splenomegalia, pericarditi fibrinose con iniziali fenomeni di neo-vascolarizzazione, opacamento dei sacchi aerei con rare organizzazioni fibrinose, sinusiti catarrali ed enteriti di grado variabile da lieve a moderato.

Gli accertamenti batteriologici eseguiti al termine della sperimentazione su organi e tessuti dei gruppi OC e IM hanno dato esito negativo mentre quelli del gruppo EV sono riportati in tabella 2.

All'arrivo tutti i soggetti sono risultati negativi alla PCR per RA, condotta da tampone tracheale. I risultati alla stessa analisi ottenuti nel corso della sperimentazione vengono riportati in tabella 1.

Età	14 gg.				41 gg.				54 gg.			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pool	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Gruppo IM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Gruppo OC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controllo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 1. Risultati della PCR per RA applicata ai tamponi tracheali eseguiti durante la sperimentazione.

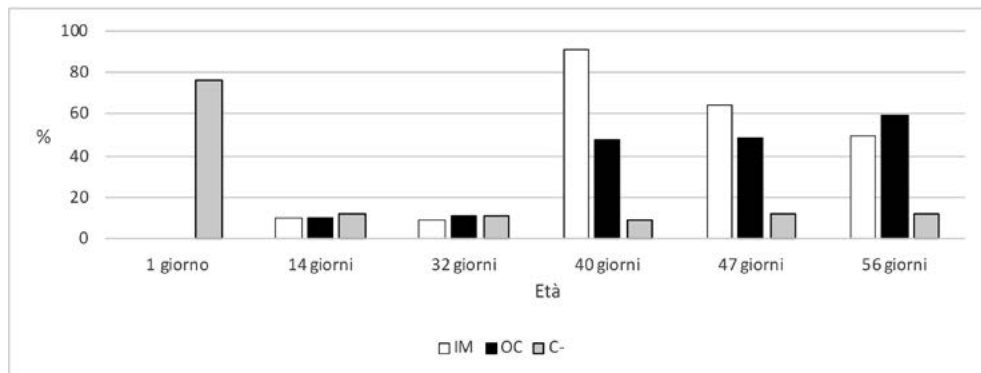
Le PCR per RA eseguite in pool da sacchi aerei e articolazioni nel corso dell'esame autoptico hanno dato esito positivo solo nel gruppo infettato per via oculo-congiuntivale.

I risultati della ricerca di anticorpi prodotti nei confronti di RA sono stati normalizzati rispetto ai controlli ed espressi in percentuale S/P (Figura 1).

Soggetto	Sacco aereo	Polmone	Fegato	Milza	Cervello	Articolazione
1	-	-	-	-	+ (ind)	+
2	+	-	+ (ind)	-	-	+ (ind)
3	+	-	-	-	+	+ (ind)
4	-	-	+ (ind)	+ (ind)	-	+ (ind)
5	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-
8	+	-	+ (ind)	+ (ind)	+	+
9	-	-	+ (ind)	-	-	+ (ind)
10	-	-	-	-	+	-

Tabella 2. Esito degli accertamenti batteriologici eseguiti sul gruppo infettato per via EV (ind= positività ottenuta all'esame batteriologico indiretto).

Figura 1. Media dell'andamento del titolo anticorpale rilevato nei gruppi infettati per via intramuscolare (IM), oculo-congiuntivale (OC) e nel gruppo di controllo (C-).



DISCUSSIONE

I modelli di riproduzione sperimentale della malattia adottati per via OC e IM, non hanno dato origine ai classici sintomi respiratori e neurologici associati alla riemersione del tacchino, ma solo a transitorie forme di zoppia di grado variabile. Questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura per la via OC, ma in contrasto con quanto descritto in un altro studio analogo in cui l'infezione per via IM aveva causato sintomatologia e lesioni anatomico-patologiche gravi (Smith et al., 1987). Si conferma invece la validità nella via endovenosa ai fini di riprodurre un'infezione nella forma clinica classica. Tale rilievo è supportato anche dall'isolamento del microrganismo dagli organi prelevati in sede autoptica, tra i quali spicca la diffusa positività a livello articolare (7/10) che si conferma una localizzazione d'elezione per RA.

Le analisi sierologiche hanno evidenziato una certa reattività nei soggetti all'arrivo che, non essendo frutto di immunizzazione dei genitori, può essere ricondotta solo ad anticorpi materni da infezione, forse sub-clinica, nel corso del ciclo produttivo dei riproduttori. Questa positività decresce velocemente già dopo 2 settimane e rimane bassa sino al momento dell'infezione sperimentale. L'infezione ha comportato un rapido innalzamento del titolo anticorpale già rilevabile dopo 8 gg., mentre il gruppo controllo si è mantenuto su valori bassi pressoché costanti (attorno al 10%) nel corso dell'intera sperimentazione. Si osserva un andamento opposto del titolo anticorpale dei soggetti infettati per via IM rispetto a quelli infettati per via OC. Infatti, nel gruppo IM, dopo un picco iniziale che ha superato il 90%, si assiste ad un suo costante decremento, mentre nel gruppo OC, sebbene la reattività fosse minore del 50% a 8 gg dall'infezione, si osserva un lento ma costante aumento, sino a superare quella del gruppo IM a fine prova. Questo andamento potrebbe essere il frutto della persistenza del microrganismo nelle vie respiratorie superiori dei soggetti infettati per via OC, come evidenziato dai risultati della PCR a 54 gg., che non si è verificato nel gruppo IM. È possibile che, nel gruppo OC, RA sia rimasta nella mucosa congiuntivale o abbia raggiunto le cavità nasali attraverso il dotto lacrimale, e qui sia rimasta senza colonizzare la trachea, se non dopo il 41° giorno di vita.

Il test sierologico sviluppato si è comunque dimostrato adeguato a rilevare anticorpi evocati attraverso entrambe le vie d'infezione inizialmente adottate (IM e OC), ma anche anticorpi verosimilmente di origine materna presenti all'arrivo e calati sensibilmente 20 giorni prima dell'infezione sperimentale. Tale test potrebbe trovare applicazione in futuro per studiare la persistenza di anticorpi nella progenie di gruppi di riproduttori vaccinati per RA, che ad oggi non è noto.

I risultati ottenuti sottolineano quanto la riproduzione clinica della riemerellosi in condizioni sperimentali attraverso vie d'inoculazione naturali, sia imprescindibile da un mix fattori predisponenti, infettivi e non, che solo le condizioni di campo possono garantire.

Il modello sperimentale di riproduzione della malattia messo a punto nel presente studio potrà essere impiegato per studiare l'efficacia di vaccini che consentiranno di ridurre il ricorso alla somministrazione di antimicrobici e contribuire al contrasto al fenomeno dell'antimicrobicoresistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Christensen, H. & Bisgaard, M. (2010). Phylogenetic relationships of *Riemerella anatipestifer* serovars and related taxa and an evaluation of specific PCR tests reported for *R. anatipestifer*. Journal of Applied Microbiology, 108, 1612-1619.
3. Crowther, J. R. (2009). The ELISA guidebook (Vol. 566). New York, NY, USA. Humana press.
4. Eugene, C. Y., & Hackett, M. (2000). Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. Analyst, 125(4), 651-656.
5. Giovannetti L. & Pascucci S. (1983). Evoluzione dell'infezione da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino e nel pollo da carne. La Clinica Veterinaria, 106, 42-44.
6. Pascucci S., Pacchioni G., Tagliabue S., & Giovanetti L. (1981). Infezioni da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino. La Clinica Veterinaria, 104, 10-11, 352-354.
7. Riemer O. (1904). Short communication about an exudative septicaemia observed in geese and its causative agent. Zentralblatt Bakteriologie, 37: 641-648.
8. Smith, J. M., Frame, D. D., Cooper, G., Bickford, A. A., Ghazikhanian, G. Y., & Kelly, B. J. (1987). *Pasteurella anatipestifer* infection in commercial meat-type turkeys in California. Avian Diseases, 913-917.