



Camera di Commercio
Forlì-Cesena



**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

ATTI del XLVIII Convegno Annuale



Forlì, 1-2 Aprile 2009

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE ATTI del XLVIII Convegno Annuale

In copertina: dipinto di **Salvo Caramagno**, “**Portando i polli al mercato**”

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
del XLVIII Convegno Annuale**

Forlì, 1-2 Aprile 2009

Indice

Prefazione	pag. 7
------------------	--------

INCONTRO

LE PRINCIPALI TEMATICHE DI CARATTERE SANITARIO CHE HANNO CARATTERIZZATO L'ULTIMO SCORCIO DEL 2008 E L'INIZIO DEL 2009

- *Antonia Ricci, Veronica Cibin* - Attivita' del Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi 2008 - 2009 pag. 11
- *Calogero Terregino* -La vaccinazione per la malattia di Newcastle pag. 13
- *Leonardo James Vinco, Giovanni Ortali e Luigi Gavazzi* - Malattie respiratorie nel tacchino, broiler ed ovaiole pag. 17
- *Marco Tamba* - Aggiornamento sulla West Nile Disease pag. 19

CONVEGNO

MICOPLASMI E MICOPLASMOSSI: AGGIORNAMENTI SU CLINICA, EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSI E CONTROLLO

- *Stanley H. Kleven* - Micoplasmosi aviare: recenti dati sulla eziologia, diagnosi e controllo pag. 29
- *Giovanni Tosi, Salvatore Catania* - Diagnosi diretta e indiretta e identificazione di *Mycoplasma* spp pag. 35
- *Chris Morrow* - Il controllo delle micoplasmosi aviari con la vaccinazione pag. 41

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- *Aiudi G., Nicassio M., Pagana G., Silvestre F., Lacalandra G.M.*
INDUCTION OF SEXUAL ACTIVITY IN MALE AND FEMALE FARMED OSTRICHES (*STRUTHIO CAMELUS*) WITH GNRH IMPLANT pag. 46
- *Bano L., Drigo I., Bacchin C., Marcon B., Cocchi M., Bonci M., Vascellari M., Agnoletti F.*
APPLICATION OF A PCR METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF ULCERATIVE ENTERITIS: PRELIMINARY RESULTS pag. 50
- *Bonci M., Drigo I., Agnoletti F., Cocchi M., Guolo A., Bano L.*
OUTBREAK OF PSEUDOTUBERCULOSIS IN COMMERCIAL GUINEA FOWLS (*NUMIDA MELEAGRIS*) pag. 54
- *Circella E., Pennelli D., Tagliabue S., Ceruti R., Giovanardi D., Camarda A.*
VIRULENCE-ASSOCIATED GENES IN AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* OF TURKEY pag. 57
- *Colmegna S., Invernizzi A., Mascher A., Corsale E., Ferrazzi V., Grilli G.*
MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF POULTRY MEATS - RESULTS OF INSPECTIONS CARRIED OUT IN THE PROVINCE OF MILAN pag. 63
- *Drigo I., Agnoletti F., Bacchin C., Guolo A., Cocchi M., Bonci M., Bano L.*- DIFFUSION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* NETB POSITIVE STRAINS IN HEALTHY AND DISEASED CHICKENS pag. 70
- *Franciosini M.P., Casagrande Proietti P., Moscati L., Battistacci L., Pela M. and Tacconi G.*
INVESTIGATIONS OF SOME PARAMETERS OF NATURAL IMMUNITY IN MEAT TURKEYS REARED OUTDOORS pag. 74

- *Saita M., Bano L., Gallazzi D.* - PATHOGENICITY MARKERS OF *CLOSTRIDIUM* SPP. IN COMMERCIAL TURKEYS. pag. 78
- *Shtylla T., Circella E., Madio A., Di Paola G., Çabeli P., Kumbe I., Kika A., Camarda A.* ANTIMICROBIAL MULTIPLE RESISTANCE OF AVIAN *ESCHERICHIA COLI* IN ALBANIA pag. 83
- *Cecchinato M., Lupini C., Ricchizzi E., Brown P., Spada D., Naylor C.J., Catelli E.* EVOLUZIONE ANTIGENICA DI *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE pag. 88
- *Falchieri M., Brown P.A., Catelli E. and Naylor C.J.* UTILIZZO DI *REVERSE GENETICS* PER LA MESSA A PUNTO DI UN CONTROLLO POSITIVO PER LA RILEVAZIONE E DISTINZIONE, MEDIANTE RT NESTED PCR, DI *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE SOTTOTIPO A E B. pag. 91
- *Ganapathy K., Catelli E., Benedetti V., Lupini C., Ricchizzi E., Lemiere S., Montiel E., Jones R.C.* ASSOCIAZIONE FRA VACCINI VIVI ATTENUATI NELLA PROFILASSI DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE E DELL'INFEZIONE DA *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE NEL POLLO pag. 93
- *Lupini C., Cecchinato M., Naylor C.J., Catelli E.* - SVILUPPO DI UN CLONE INFETTIVO DI *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE DELETO DEL GENE SH, CODIFICANTE LA PROTEINA GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)..... pag. 98
- *Massi P., Tosi G.* - INFEZIONE DA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* IN POLLI DA RIPRODUZIONE CON TRASMISSIONE ALLA PROGENIE: EVOLUZIONE DELLA MALATTIA ED ASPETTI DIAGNOSTICI pag. 101
- *Massi P., Tosi G., Vandi L., Piva A.* - PROVA DI INFEZIONE SPERIMENTALE CON UN CEPPLO DI *SALMONELLA HADAR*, ISOLATO DAL CAMPO, IN POLLI SPF E CONTROLLO DELLA REPLICAZIONE ED ESCREZIONE BATTERICA MEDIANTE L'UTILIZZO DI UN PRODOTTO A BASE DI ACIDI ORGANICI ED AROMI NATURAL-IDENTICI MICROINCAPSULATI (BREV. EUROPEO N. 1391155 B1) MISCELATO NELL'ALIMENTO IN CONCENTRAZIONI DIVERSE..... pag. 103
- *Ricchizzi E., Lupini C., Cecchinato M., Brown P., Naylor C.J., Catelli E.* - FOCOLAIO DI RINOTRACHEITE INFETTIVA DEL TACCHINO (TRT), DA *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE DI ORIGINE VACCINALE, IN TACCHINI DI 7 SETTIMANE..... pag. 107
- *Ricchizzi E., Falchieri M., Lupini C., Cecchinato M., Meini A., Bianchi E., Catelli E.* INDAGINI DI CAMPO SULL'INFEZIONE DA *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE NELL'ALLEVAMENTO DELLA GALLINA OVAIOLA pag. 111
- *Taddei R., Tosi G., Massi P.* - OTTIMIZZAZIONE DI UN METODO PCR PER LA RICERCA DI *SALMONELLA* SPP. DA MANGIMI pag. 116
- *Vida P., Mammone T., Lavazza A., Moretto A.* PROGETTO EUROPEO ECORAIP: EUROPEAN CONTENT FOR PUBLIC HEALTH AWARENESS OF RURAL POPULATION ON AVIAN INFLUENZA PREVENTION (2007-2008) pag. 121
- INDICE DEGLI AUTORI** pag. 127

La SIPA è grata alla Camera di Commercio di Forlì - Cesena per il pluriennale sostegno e per il contributo concesso in occasione del XLVIII Convegno Annuale.

Un ringraziamento va anche alla Fiera di Forlì ed all'IZSLER di Brescia.

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2009 sono realizzate grazie al contributo di:

- ALPHARMA ANIMAL HEALTH
- AVIAGEN ITALIA
- BAYER SANITÀ ANIMALE
- CEVA VETEM
- DOX-AL
- ELANCO
- FATRO
- FORT DODGE
- HUVEPHARMA
- INTERVET/SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH
- IZO
- LOHMANN ANIMAL HEALTH
- MERIAL ITALIA
- TRE I

PREFAZIONE

Il comparto avicolo, sia da carne che da uova, riveste un'importanza fondamentale nella zootecnia nazionale. Fiore all'occhiello di questa produzione è la qualità raggiunta dai prodotti avicoli che sempre più spesso presentano standard elevatissimi in grado di rispondere pienamente anche ai requisiti dei consumatori più esigenti.

Per ottenere questa "qualità" dei prodotti è però necessario che in allevamento venga garantito un ambiente idoneo tale da preservare gli animali dalle malattie e garantendone il pieno rispetto del benessere.

Malgrado il rispetto delle rigide norme di biosicurezza, la profilassi vaccinale e gli intensi sforzi delle aziende e dei tecnici che seguono l'allevamento, le patologie sono sempre presenti e spesso riconoscono un'eziologia multifattoriale e si manifestano con sintomatologia clinica non sempre evidente.

Tra le tante malattie presenti nell'avicoltura commerciale, le micoplasmosi che sono da sempre oggetto di particolari attenzioni da parte del mondo produttivo e della ricerca, richiedono particolare attenzione per i danni economici rilevanti e per i riflessi negativi che possono avere sulla qualità delle carcasse e quindi delle carni.

A tale proposito, si assiste ad un continuo interesse da parte dei ricercatori e dei tecnici, rivolto a chiarire e indagare tutti quegli aspetti di questa poliedrica malattia in grado di dare indicazioni utili e precise sulle caratteristiche delle micoplasmosi, e permetterne così un migliore controllo.

Per tale motivo, anche supportati dalle richieste dei colleghi di campo e di laboratorio, si è deciso di affrontare nel corso del 48° convegno della Società Italiana di Patologia Aviare il tema "Micoplasmi e Micoplasmosi".

Lo scopo dell'incontro è quello di fornire un aggiornamento scientifico sia sugli aspetti clinici che su quelli epidemiologici naturalmente senza tralasciare i nuovi approcci diagnostici, essenzialmente basati su tecniche molecolari, per poi chiarire gli aspetti di profilassi e di terapia.

Per soddisfare queste esigenze e con la precisa volontà di fornire indicazioni chiare e facilmente applicabili, il Convegno sarà articolato in diversi interventi, sia sottoforma di relazioni ad invito, che vedono coinvolte figure di spicco della patologia aviaria nazionale ed internazionale, che di comunicazioni orali dei Soci che riferiranno i risultati di specifici studi sul tema .

Dr. Guido Grilli
Segretario SIPA

Dott. Antonio Lavazza
Presidente SIPA

INCONTRO

Le principali tematiche di carattere sanitario che hanno caratterizzato l'ultimo scorcio del 2008 e l'inizio del 2009

ATTIVITÀ DEL CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LE SALMONELLOSI 2008-2009

Ricci Antonia, Cibir Veronica

Il Regolamento 2160/2003, “sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti”, definisce la necessità, per talune zoonosi, di stabilire misure di controllo specifiche, che devono essere rapportate ad obiettivi di riduzione graduale della prevalenza.

Dal 2008 è attivo oltre al piano di controllo di salmonella nei riproduttori della specie *Gallus gallus* (il 2009 è il terzo anno di applicazione) anche il piano di controllo di salmonella nelle galline ovaiole; inoltre nel 2008 è stato approvato il piano di controllo di salmonella nei polli da carne che è attivo sul territorio nazionale a partire da gennaio 2009.

Sulla base dei risultati dello studio relativo alla valutazione della prevalenza di *Salmonella* spp. in gruppi di galline ovaiole effettuato tra ottobre 2004 e settembre 2005 in ottemperanza alla Decisione 2004/665/CE sono stati stabiliti obiettivi comunitari di riduzione della prevalenza (Regolamento CE 1168/2006) per questa categoria produttiva

L'obiettivo comunitario di riduzione della prevalenza di *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium nelle galline ovaiole adulte della specie *Gallus gallus* in accordo a quanto stabilito dal Regolamento CE 1168/2006 deve essere una riduzione percentuale minima annuale di gruppi positivi di almeno il 10% se la prevalenza stimata nel precedente anno risultava inferiore al 10%.

In ottemperanza a quanto previsto nel Regolamento CE 2160/2003 l'Italia ha presentato e ottenuto l'approvazione (Decisione 2007/848/CE) di un piano di controllo nazionale di durata triennale finalizzato a ridurre la prevalenza di *S. Enteritidis* e Typhimurium dall'8.1% (prevalenza stimata sulla base dei criteri definiti dalla Decisione 2004/665/CE) al 7.2% nel primo anno; dal 7.2 % al 6.5% nel secondo anno e dal 6.5% a meno del 6% nel terzo anno.

Il programma si basa sullo schema di monitoraggio stabilito dal Regolamento (CE) 1168/2006, che prevede campionamenti da effettuarsi su iniziativa dell'allevatore (autocontrollo) e controlli ufficiali da eseguirsi presso l'azienda. Le misure di controllo consistono nell'abbattimento o nella macellazione dei gruppi risultati positivi per *S. Enteritidis* e/o Typhimurium e nella vaccinazione degli animali utilizzati per ripopolare un capannone che ospitava nel precedente ciclo un gruppo risultato positivo per *S. Enteritidis* e/o Typhimurium, oltre che nella distruzione o trattamento termico delle uova prodotte dai gruppi risultati positivi.

Sulla base di quanto emerso a seguito del primo anno di applicazione (2008) è stato possibile valutare l'evoluzione della situazione epidemiologica ed evidenziare criticità legate ad alcuni aspetti applicativi.

A partire dal 2008 è inoltre attivo il piano di controllo nazionale di *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium nei polli da carne della specie *Gallus gallus*; gli obiettivi comunitari di riduzione della prevalenza per questa categoria produttiva sono stati stabiliti sulla base dei risultati dello studio relativo alla valutazione della prevalenza di *Salmonella* spp. in gruppi di polli da carne effettuato tra ottobre 2005 e settembre 2006 in ottemperanza alla Decisione 2005/636/CE.

L'obiettivo comunitario di riduzione della prevalenza di *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium nei polli da carne della specie *Gallus gallus* in accordo a quanto stabilito dal Regolamento CE 646/2007 deve essere una riduzione percentuale massima di gruppi positivi all'1% entro il 31 dicembre 2011.

In ottemperanza a quanto previsto nel Regolamento CE 2160/2003 l'Italia ha presentato e ottenuto l'approvazione (Decisione 2008/815/CE) di un piano di controllo nazionale di durata triennale finalizzato a ridurre la prevalenza di *S. Enteritidis* e Typhimurium dal 2.3 % (prevalenza stimata sulla base dei criteri definiti dalla Decisione 2005/636/CE) al 1% in 3 anni di applicazione.

Il programma si basa sullo schema di monitoraggio stabilito dal Regolamento CE 646/2007, che prevede campionamenti da effettuarsi su iniziativa dell'allevatore (autocontrollo) e controlli ufficiali da eseguirsi presso l'azienda. Le misure di controllo consistono essenzialmente nell'ottimizzazione delle misure di biosicurezza a seguito dell'effettuazione di una accurata indagine epidemiologica. Il piano prevede l'applicazione di misure sanitarie restrittive finalizzate a tutelare la salute dei consumatori da applicare quando venga confermata la positività ad almeno uno dei due sierotipi rilevanti.

Con Decisione 2008/897/CE la Commissione Europea approva e cofinanzia i piani di controllo italiani per il 2009 per un totale di 1.100.000 euro senza distinzione tra riproduttori *Gallus gallus*, ovaiole e polli da carne.

Con tale Decisione vengono di fatto approvate anche le modifiche ai piani di controllo relativi alle categorie produttive riproduttori *Gallus gallus* e galline ovaiole trasmesse alla Commissione nel 2008 e descritte in dettaglio nella nota del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali del 9 febbraio 2009. Tali modifiche in sintesi consistono: nell'introduzione di un campionamento di conferma nel caso in cui il campionamento ufficiale di routine abbia evidenziato la positività a sierotipi rilevanti; modifica della frequenza dei campionamenti da eseguirsi in autocontrollo e specifiche relative alle misure restrittive previste per gruppi di galline ovaiole che producono uova destinate alla pastorizzazione.

LA VACCINAZIONE PER LA MALATTIA DI NEWCASTLE

Calogero Terregino

Centro di Referenza Nazionale, Laboratorio OIE/FAO per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 - 35020 Legnaro (PD)

La malattia di Newcastle rappresenta ancora oggi in tutto il mondo una problematica sanitaria estremamente penalizzante per l'avicoltura. L'impatto economico di questa malattia, sia nei paesi in via di sviluppo, a causa della forte presenza di ceppi ad alta virulenza, sia nei paesi industrializzati, per le misure di profilassi e di controllo adottate per contrastarla, è enorme e difficilmente superabile da altre malattie di interesse zootecnico.

La profilassi indiretta nei confronti della malattia di Newcastle, prevede essenzialmente l'uso di vaccini vivi e vaccini inattivati. I vaccini vivi allestiti con virus lentogeni sono gli unici autorizzati in Europa. Infatti, la direttiva 93/152/EEC vieta l'impiego di vaccini allestiti con virus il cui indice di patogenicità intracerebrale (ICPI) sia superiore a 0,4. I ceppi maggiormente utilizzati in Italia sono: l'Hitchner B1, il La Sota, il Clone 30 (nato dalla clonazione del ceppo La Sota), e alcuni ceppi enterotropi: 6/10 e VG/GA. I ceppi vaccinali a patogenicità intermedia (Roakin, Komarov, Mukteswar), sono utilizzati solo nei paesi in via di sviluppo in Africa, Medio Oriente e Sud-Est asiatico, dove i virus ad alta patogenicità sono endemici. Anche per i vaccini inattivati, la legislazione Europea pone delle regole nella produzione approvando solo quelli allestiti con virus con ICPI inferiore a 0,7.

La vaccinazione oltre ad essere utilizzata come strumento di profilassi è ammessa dalla normativa europea come sostegno alle politiche di eradicazione. I risultati e le aspettative legate alla vaccinazione dipendono in gran parte dalle caratteristiche dominanti della filiera avicola (tipologia, consistenza e densità degli allevamenti, livelli medi di biosicurezza), dall'efficienza dei servizi veterinari e dalla situazione epidemiologica della malattia in un determinato Paese.

Il controllo della malattia, ossia la protezione delle forme cliniche conseguenti all'infezione di ceppi virulenti, rappresenta solo uno degli obbiettivi che si deve ottenere con la vaccinazione. In molti Paesi in via di sviluppo è l'obbiettivo primario se non il solo realmente raggiungibile. Questo si può raggiungere però solo con una vaccinazione adeguata a tappeto. Attualmente i vaccini in commercio si dimostrano molto efficaci e relativamente sicuri quando applicati correttamente. L'efficacia della vaccinazione è, infatti, legata ad una serie di fattori che possono essere sintetizzati in questo modo:

- 1) Le proprietà del vaccino (caratteristiche del ceppo vaccinale, concentrazione delle proteine immunogenicamente rilevanti, adiuvanti utilizzati);
- 2) Il metodo di somministrazione (per esempio la somministrazione di massa per spray garantisce sicuramente i risultati migliori, mentre quella in acqua da bere, se pure più pratica, dà spesso risultati scadenti) o errori nella somministrazione del vaccino (difetti nell'attrezzatura adibita alla vaccinazione, concomitante somministrazione di farmaci in grado di inibire la risposta immunitaria);
- 3) Un'impropria conservazione dei vaccini;

- 4) L'interferenza degli anticorpi materni, che può ridurre l'efficacia dei vaccini vivi somministrati nei primi giorni di vita;
- 5) L'interferenza di altri ceppi vaccinali (pneumovirus, coronavirus), che possono limitare la replicazione dei ceppi ND vaccinali;
- 6) Malattie immunosoppressive o debilitanti;
- 7) Le caratteristiche del virus di campo (virulenza, similitudine con i ceppi utilizzati per la vaccinazione).

Oltre a limitare o eliminare le problematiche sanitarie collegate alla malattia, un altro importante obiettivo della vaccinazione è quello di creare una popolazione più resistente all'infezione. Qualsiasi vaccinazione non è in grado di fornire una protezione globale all'intera popolazione nella quale è utilizzata, tuttavia può incrementare significativamente la numerosità della popolazione refrattaria all'infezione. E' ovvio che, essendo la possibilità di infettarsi strettamente correlata alla dose infettante, questo obiettivo sarà maggiormente raggiungibile se di pari passo sono attuati rigorosi interventi di profilassi diretta in grado di ridurre drasticamente l'entità della carica infettante ambientale.

Senza dubbio un altro importantissimo compito della vaccinazione per la malattia di Newcastle deve essere quello di ostacolare la diffusione di ceppi virulenti. Anche in questo caso è impossibile ipotizzare, specie in condizioni di campo, di ottenere una popolazione vaccinata in grado di non diffondere il virus responsabile dell'infezione. Tuttavia è stato più volte dimostrato che in soggetti con un elevato grado di immunità acquisita la durata è l'intensità dell'escrezione virale si riduce significativamente. Questo obiettivo può essere raggiunto con mirate strategie di vaccinazione d'emergenza in grado di assicurare uniformi titoli anticorpali elevati.

In Italia la vaccinazione profilattica è stata resa obbligatoria nel 2001 da un provvedimento ministeriale emanato in seguito all'epidemia del 2000 (nota prot. 600.6/24461/25N/118) modificato da un successivo provvedimento nel 2005 (nota prot. DGVA.Vm/29204/P -I.8.d/158) in cui sono stati ridotti gli interventi vaccinali in alcune categorie produttive e privilegiato l'uso di vaccini vivi attenuati al fine di favorire i metodi di vaccinazioni di massa. Tale piano di vaccinazione minimo ha il fine di conferire un livello anticorpale uniforme e sufficientemente protettivo nelle specie sensibili per evitare i danni diretti provocati dalla malattia e limitare un'eventuale diffusione di virus molto virulenti. Di recente è iniziato uno studio di valutazione dell'efficacia dell'attuale piano di vaccinazione per la Newcastle.

Utilizzare la vaccinazione come strumento per arrivare all'eradicazione della malattia di Newcastle è attualmente impensabile in Italia a causa della consistenza e della densità degli allevamenti avicoli, concentrati in limitate aree (*Densely Populated Poultry Area*) e dell'impossibilità di applicare in modo omogeneo efficaci misure di biosicurezza.

La continua circolazione di ceppi virulenti nel pollame in Europa e la presenza endemica della malattia in alcune popolazioni di uccelli selvatici come i columbiformi, non permettono di abbassare il livello di attenzione e di ridurre le misure di prevenzione verso questa malattia. Anche in Italia non è infrequente riscontrare alla macellazione titoli anticorpali elevati non giustificabili dalla vaccinazione segno di infezione con ceppi di campo.

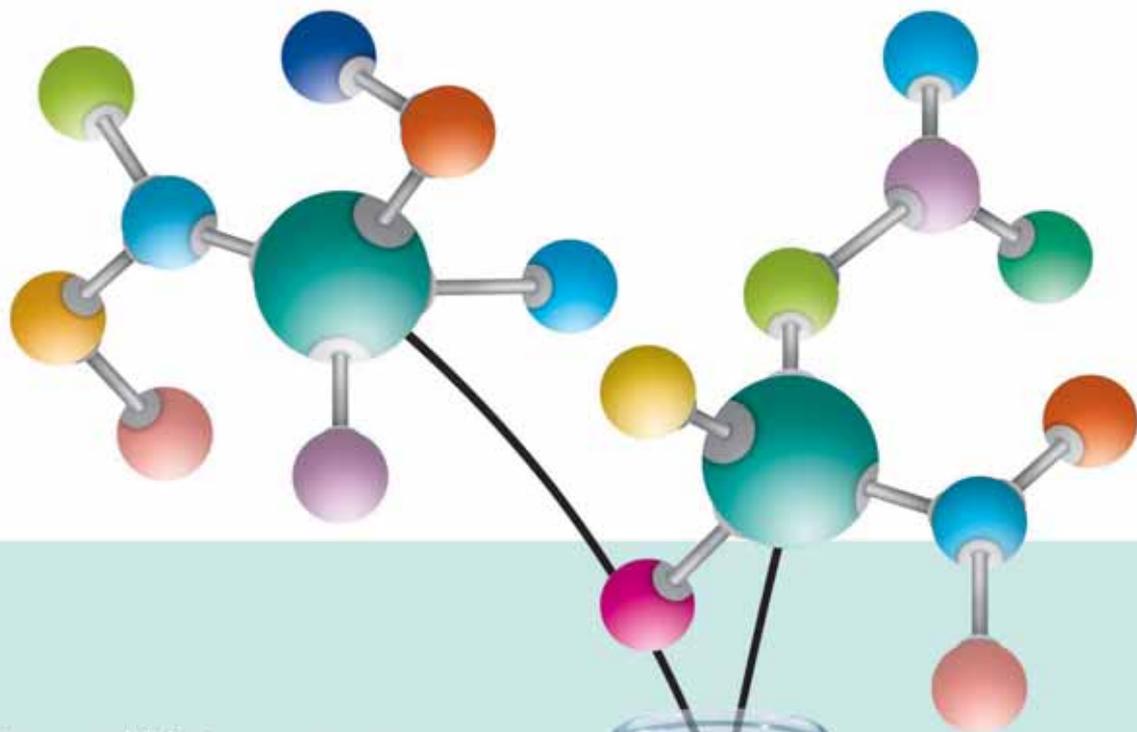
Per questi motivi un'efficace profilassi vaccinale trova ancora piena giustificazione in una realtà avicola come quella italiana. E' ovvio che la profilassi vaccinale minima

obbligatoria deve essere pensata in modo da essere facilmente praticabile, poco penalizzante per le produzioni, relativamente economica e nello stesso tempo in grado di assicurare un'immunità di popolazione o di allevamento (herd immunity) tale da ostacolare in modo significativo la diffusione di ceppi virulenti o quantomeno garantire alla popolazione vaccinata di rispondere efficacemente in tempi brevi ad una straordinaria immunizzazione di emergenza a seguito di epidemia.

Recenti studi in Olanda hanno dimostrato che affinché la vaccinazione possa realmente ostacolare la diffusione dei ceppi virulenti, occorre far sì che almeno una quota importante della popolazione sensibile abbia un livello minimo protettivo. La legislazione Olandese prevede, infatti, che il 90% degli animali vaccinati abbia un titolo in HI non inferiore a 1:8.

Un approccio simile è portato avanti da alcuni anni in Australia. Nel programma di vaccinazione obbligatorio emanato a seguito dell'epidemia del 2001 è previsto un parallelo controllo dell'efficacia vaccinale al fine di stimare il titolo anticorpale ottenuto in allevamento. La protezione è giudicata adeguata se il titolo medio dell'allevamento in HI non è inferiore a 1:8 e se almeno i 2/3 degli animali hanno un titolo in HI non inferiore a 1:32.

Vaccini di nuova generazione (vaccini ricombinanti, con subunità virali) in grado di immunizzare gli animali senza infezione potranno forse in futuro rendere possibile l'eradicazione di questa malattia anche in Italia. Nel frattempo è necessario ottimizzare al meglio la strategia vaccinale con gli strumenti attualmente disponibili. A tal fine accanto al piano di vaccinazione obbligatorio occorre predisporre un piano di monitoraggio efficacia in grado di individuare criticità responsabili di una scadente immunizzazione o di un'immunizzazione eccessivamente disomogenea. Ciò permetterebbe di intervenire dove occorre e di far rispettare gli obiettivi minimi prefissati dal piano stesso.



Qualità rara.

www.izo.it

IZO da oltre trent'anni produce farmaci e vaccini ad uso veterinario, facendo della qualità totale e dell'innovazione tecnico-scientifica i suoi capisaldi. Nasce così una gamma di prodotti altamente affidabili in grado di garantire, insieme alla professionalità dei medici veterinari e la cura degli allevatori, il benessere assoluto degli animali da reddito. **Per IZO la ricerca della qualità è una qualità rara.**



IZO S.p.A. • Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia
Tel. 030 24 20 583 • Fax 030 24 20 550

MALATTIE RESPIRATORIE NEL TACCHINO, BROILER E OVAIOLE

L. J. Vinco, G. Ortali e L. Gavazzi

Le patologie negli avicoli interessano principalmente tre sistemi: respiratorio, digerente e locomotore. Il più delle volte il danno subìto da uno di questi sistemi si va poi a ripercuotere sugli altri. Un esempio è dato dalle forme enteriche che attraverso l'impatto negativo su lettiera ed ambiente, con sviluppo di ammoniaca creano danni all'apparato respiratorio e locomotore. Da qualche anno i principali problemi sanitari si manifestano a carico del tratto digestivo in seguito ad una nota serie di scelte quantomeno discutibili (bando delle farine di carne, auxinici, ecc.). Le patologie respiratorie tuttavia rivestono ancora un ruolo importante anche come forme non necessariamente conseguenti a disturbi enterici. Nonostante l'implemento delle misure di biosicurezza ed il miglioramento degli ambienti di allevamento svariati patogeni respiratori vengono ancora riscontrati. Nella maggioranza dei casi si tratta di forme miste, con il coinvolgimento di due o più patogeni. Di conseguenza il controllo delle forme respiratorie richiede una diagnosi accurata per arrivare ad identificare gli agenti coinvolti ed attribuirli la giusta importanza.

Un ruolo importante è rivestito dal APV come principale responsabile della maggior parte delle forme respiratorie nel tacchino. In infezioni sperimentali APV evoca una blanda sintomatologia con interessamento del primo tratto respiratorio, ma in campo è noto come principale fattore predisponente di gravi patologie secondarie soprattutto a E. Coli. Nell'ultimo decennio l'andamento è cambiato da forme precoci a forme che colpiscono animali attorno ai 70 giorni, più facilmente controllabili. Tra i germi di irruzione secondaria ORT è uno dei più frequentemente identificati spesso mascherato da altri batteri come E. Coli, rischiando di compromettere la scelta della terapia più indicata, tanto che nella stragrande maggioranza dei casi si ha la classica sequela TRT-ORT-E. Coli. Un accenno va fatto anche alle patologie respiratorie batteriche primarie sostenute da *Pasteurella multocida*, (in forte regressione e divenuta sostanzialmente sporadica) e da *Riemerella anatipestifer* che determina quadri respiratori, con sintomatologia nervosa a decorso generalmente non grave. Sono stati segnalati già da tempo, casi di anoressia transitoria e depressione sostenuti da ceppi di virus Newcastle identificati da tamponi tracheali e PCR, come a bassa patogenicità.

Nel pollo da carne, nel riproduttore pesante e nelle galline leggere un ruolo ancora prevalente nelle patologie respiratorie è rivestito dai Coronavirus. Gli studi epidemiologici hanno evidenziato la prevalenza in diverse aree, di ceppi varianti come 793B, Qx like, ITA02, e ceppi Massachusetts. I quadri sono caratterizzati da insorgenza di fatti respiratori che evolvono in funzione della qualità manageriale in forme anche complesse aggravate da complicanze batteriche. Si sono ridotti i quadri nefritici, che avevano caratterizzato la prima circolazione del ceppo Qx. L'APV continua a rappresentare un problema per tutte le specie, anche se con caratteristiche diverse rispetto al tacchino, essendo fortemente condizionato da fattori manageriali, (qualità del microclima, lettiera ecc.). Da ricordare il riemergere della laringotracheite segnalata nel 2007 e apparsa sporadicamente anche nel

corso del 2008, che ha interessato anche gruppi di galline leggere in fase pollastra e prodotti di nicchia, quali capponi e galletti. Segnalati casi di corizza infettiva nelle linee leggere. Comune alle varie specie è il capitolo relativo alle micoplasmosi. La prevalenza nel tacchino risulta ridotta rispetto al periodo (2000-2003), in cui *M. gallisepticum* e *sinoviae* hanno rappresentato una delle principali cause di patologia respiratoria e complicanza batterica, andamento meno positivo si è manifestato nella specie *gallus gallus*. Infatti si è verificata una sostenuta circolazione di *mycoplasma sinoviae* sia nei riproduttori pesanti, che nelle linee leggere. Da segnalare la prevalenza di quadri respiratori anche gravi in presenza di tale infezione, sia da trasmissione verticale che orizzontale.

AGGIORNAMENTO SULLA WEST NILE DISEASE

Marco Tamba

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia-Romagna “B. Ubertini”, Brescia

Email: marco.tamba@bs.izs.it

Introduzione

Dieci anni dopo la sua prima segnalazione [2] il virus West Nile (WNV) si è manifestato nuovamente in Italia. In Italia tra agosto e ottobre 2008 sono stati segnalati complessivamente 32 casi clinici (5 decessi) in equini delle Province di Mantova, Rovigo, Padova, Ferrara, Bologna e Modena. Inoltre positività in PCR sono state rilevate in diverse specie di uccelli (cornacchia, gazza, ghiandaia, cormorano, gabbiano e piccione) e in due pool di zanzare (*Culex pipiens*) prelevate nelle medesime province. Per la prima volta, infine, sono stati segnalati casi umani di malattia [6].

Tra gli episodi italiani del 1998 e del 2008 si è verificata in Nord America una drammatica epidemia che ha trasformato la febbre da WNV da arbovirosi minore a problema rilevante di Sanità Pubblica e Sanità Pubblica Veterinaria [8].

Il virus West Nile

Il WNV è un RNA-virus del genere *Flavivirus*, famiglia *Flaviridae*. Appartiene al complesso antigenico della Encefalite Giapponese (JE) che comprende diversi patogeni umani, quali il virus dell'Encefalite Giapponese in Asia, quello dell'Encefalite di Saint-Louis in America, quello dell'Encefalite della Valle del Murray e il virus Kunjin in Australia (Fig.1).

Il WNV è considerato endemico nel bacino del Mediterraneo, è stato isolato in molti Paesi europei e nordafricani dagli anni sessanta agli anni ottanta, comunque solamente negli ultimi 15 anni sono stati registrati diversi focolai di una certa rilevanza che hanno coinvolto sia cavalli che uomini [4].

Epidemiologia e ciclo di trasmissione

Il ciclo di trasmissione naturale del WNV coinvolge zanzare, come serbatoio e vettore biologico, e uccelli come ospiti amplificatori. La malattia presenta un ciclo silvestre tra zanzare ornitofile e uccelli selvatici (fig. 2), in determinate situazioni, però, può anche instaurare cicli in ambiente urbano (Bucarest, Volgograd, New York): il virus trasportato in ambiente urbano da zanzare “ponte” o uccelli sinantropi (passeri, storni, ecc.) può instaurare cicli di infezione. In questo caso è più elevata l'incidenza di casi umani. Il WNV è stato isolato da 11 generi diversi di zanzare, non tutte però dimostrano la medesima competenza vettoriale, in Europa e nel Bacino del Mediterraneo tale ruolo viene principalmente svolto da zanzare ornitofile del genere *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus*). I vettori si infettano e trasmettono l'infezione durante il pasto di sangue [4].

Si pensa che il virus entri in una nuova area attraverso gli uccelli migratori, pertanto non deve sorprendere che la maggior parte degli episodi di malattia si

manifesti in aree umide o in zone vicine al delta di fiumi, dove c'è convivenza tra avifauna stanziale e migratoria e abbondante presenza del vettore. Tra gli uccelli vi sono comunque differenze di competenza, il WNV è in grado di infettare centinaia di diverse specie di uccelli, ma solamente alcune sviluppano viremia di durata (da 1 a 6 giorni post-infezione) e con titolo virale tale ($>10^5$ PFU/ml di siero) da essere infettante per il vettore. Attraverso infezioni sperimentali i passeriformi sembrano essere i più efficienti ospiti amplificatori (Fig. 3, [5]). Tra questi il passero domestico e lo storno potrebbero svolgere il ruolo di "ponte" tra il ciclo silvestre e quello urbano. Nelle specie di uccelli competenti vi è anche una possibilità di trasmissione diretta del virus. Il WNV è infettante per via orale ed è stato riscontrato in tamponi orali e cloacali degli uccelli infetti. E' probabile pertanto che pratiche quali l'accoppiamento, l'alimentazione dei nidiacei, il cannibalismo e la necrofagia possano permettere l'ulteriore diffusione del virus [5]. Ad eccezione di un episodio registrato in Israele nel 1998 nel quale mostrano sintomatologia nervosa e morirono cicogne e oche domestiche, nel Bacino del Mediterraneo l'infezione da WNV negli uccelli decorre di norma in modo asintomatico [4]. Al contrario, mortalità elevate di uccelli sono state registrate in Nord America, dove il virus è stato segnalato per la prima volta nel 1999 [5]. Tra gli ordini di uccelli quelli che svolgono il ruolo di ospiti amplificatori sono i Charadriiformi (gabbiani, sterne, beccacce, chiurli) e i Passeriformi, tra i quali particolare importanza nell'ecologia del WNV rivestono soprattutto i ploceidi (passeri), gli sturnidi (storni) e i corvidi (gazze, cornacchie). Tra gli uccelli domestici un certo ruolo possono svolgere gli anseriformi, mentre galliformi e columbiformi mostrano viremie di breve durata e con titoli virali non elevati. Sono quindi in grado di mantenere il virus nell'ambiente, ma non sembrano svolgere un ruolo di amplificazione virale [1, 5].

Molte specie di mammiferi sono sensibili all'infezione. Tutti, compreso l'uomo ed il cavallo, sono però considerati ospiti a fondo cieco, in quanto in questi animali la viremia è di breve durata e con un titolo considerato non infettante per il vettore. Tra i mammiferi solo l'uomo e il cavallo mostrano sintomatologia clinica.

Uomini. Nell'uomo la maggior parte delle infezioni ha decorso asintomatico. In un 15-20% dei casi invece si manifesta, dopo un periodo di incubazione di 3-15 giorni, una sindrome influenzale (febbre, mal di testa, mialgia nausea e vomito). La sindrome dura di norma 2-3 giorni. In meno dell'1% dei casi invece la malattia si manifesta con sintomi neurologici (meningite o meningoencefalite o mielite) associati a febbre elevata. I decessi sono registrati soprattutto nei soggetti di età più elevata. Sono stati segnalati casi di trasmissione diretta dell'infezione da WNV attraverso la placenta, l'allattamento al seno, le emo-trasfusioni ed i trapianti di organo [8].

Cavalli. Anche nel cavallo la maggior parte delle infezioni da WNV ha decorso asintomatico. In poco meno del 10% dei casi però i cavalli infetti mostrano sintomatologia nervosa [2, 3]. Il periodo di incubazione è compreso tra i 3 e i 15 giorni post infezione (g.p.i.), sintomi più comunemente descritti sono paresi, atassia, cadute improvvise, difficoltà nell'andatura, fascicolazione dei muscoli, digrignamento dei denti, cecità, ptosi delle labbra, ipereccitabilità o letargia [7]. La sintomatologia nervosa è diversa da soggetto e soggetto e dipende dall'area

del sistema nervoso centrale in cui insorgono le lesioni infiammatorie (polioencefalo-mielite non suppurativa) legate alla presenza del virus. La maggior parte dei soggetti che si ammala guarisce spontaneamente; di norma il tasso di letalità (percentuale di animali malati che muoiono o vengono sottoposti a eutanasia) rimane compreso tra il 30% e il 40% [2, 7].

Anche i rettili (alligatori, serpenti e tartarughe) e le rane possono essere infettate dal WNV. Si pensa che queste specie, a causa della lunga viremia e del fatto che si ibernano siano anche in grado di svolgere un ruolo nel mantenimento del WNV nell'ambiente.

Una volta infatti passato dall'avifauna migratoria a quella stanziale, il WNV si dimostra in grado di ripresentarsi negli anni successivi. I meccanismi per l'overwintering non sono chiariti, il virus potrebbe superare l'inverno in ospiti a lunga viremia (es. rettili) o in zanzare adulte infette svernanti. E' inoltre stata dimostrata la trasmissione trans-ovarica del virus [8]. In sostanza il ciclo di trasmissione del WNV è piuttosto complesso e non ancora completamente chiarito. Implica una complessa catena di eventi, tra i quali non sono secondari l'abbondanza degli ospiti amplificatori e dei vettori, fattori climatici e stagionali e l'uso del territorio. Tutto ciò fa in modo che le epidemie da WNV siano, almeno in Europa, di limitata entità sia spaziale sia temporale, erratiche e sostanzialmente imprevedibili [4].

Piano nazionale di sorveglianza

Dal 2002 è istituito sul territorio nazionale un Piano di Sorveglianza nei confronti della WND, attualmente regolamentato dal D.M. 29/11/2007. Tale piano viene svolto con l'obiettivo di rilevare precocemente la circolazione virale attraverso attività di sorveglianza passiva e attiva. Il piano nazionale, attivato in 15 aree umide che per le loro caratteristiche ecologiche sono considerate a rischio per l'introduzione e la propagazione del WNV, prevede diverse attività:

- 1) Sorveglianza entomologica per definire le specie di culicidi presenti e la loro dinamica di popolazione;
- 2) sorveglianza passiva sull'avifauna selvatica rinvenuta morta;
- 3) sorveglianza attiva mediante l'impiego di polli sentinella, monitorati sierologicamente con cadenza quindicinale da aprile a ottobre;
- 4) sorveglianza attiva mediante l'impiego di cavalli sentinella, monitorati sierologicamente in primavera (febbraio-marzo) e in autunno (novembre-dicembre);
- 5) sorveglianza passiva sui cavalli che presentano sintomi neurologici o muoiono improvvisamente in area a rischio.

In particolare quest'ultima attività è stata quella che ha permesso di rilevare la presenza del WNV sia nel 1998 [2] sia nel 2008.

Prevenzione

Le misure di prevenzione, come per tutte le malattie trasmesse da vettori, sono finalizzate ad impedire il contatto tra gli animali (e gli uomini) suscettibili e i vettori infetti. A tal fine sono buone pratiche: l'impiego di repellenti, il ricovero notturno dei cavalli all'interno delle scuderie, l'uso di ventilatori, spegnere le luci all'interno delle strutture, mantenendone al contempo altre accese lontane

dalle strutture di ricovero degli animali, mantenere gli uccelli fuori dalle scuderie e impedire la loro nidificazione in vicinanza o all'interno delle scuderie. Utile è anche la lotta al vettore attraverso trattamenti periodici, ma più efficaci possono essere azioni quali la rimozione di possibili luoghi di riproduzione delle zanzare (raccolte di acqua stagnante, stagni, tombini, ecc.), la pulizia e lo sfalcio della vegetazione circostante le strutture. Solamente per la specie Equina sono stati sviluppati vaccini (spenti o ricombinanti) con una buona efficacia nei confronti della malattia clinica [4]. I cavalli vanno vaccinati a fine inverno (febbraio-marzo) in modo che siano immuni durante la stagione di attività del vettore (estate).

Conclusioni

Il WNV è agente di una zoonosi, endemica nel Bacino del Mediterraneo, che per motivi non ancora chiariti può improvvisamente manifestarsi verso la fine dell'estate in uccelli, cavalli e/o persone. In considerazione delle notevoli implicazioni che questa malattia ha per la Sanità Pubblica, le attività di sorveglianza nei confronti di questo agente dovrebbero essere mantenute, da giugno a ottobre, su tutto il territorio nazionale, soprattutto nelle aree adiacenti a zone umide dove transitano o nidificano uccelli migratori. A tale scopo maggiore importanza dovrebbe essere data alla sorveglianza attiva sull'avifauna stanziale e alla sorveglianza passiva sui cavalli, in quanto si sono dimostrati strumenti validi per rilevare la circolazione di ceppi patogeni.

Bibliografia

1. Allison AB, Mead DG, Gibbs SEJ, Hoffman DM, Stallknecht DE. (2004). West Nile virus viremia in wild rock pigeons. *Emerg. Infect. Dis.* 10(12): 2252-2255.
2. Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT. (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany Regione, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 8(12): 1372-1378. *Emerg. Infect. Dis.* 8(12): 1372-1378
3. Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell C. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8(4): 380-386
4. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B, (2004). West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 27:343-355.
5. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9(3): 311-322
6. Rossini G., Cavrini F, Pierro A., Macini P, Finarelli A., Po C., Peroni G., Di Caro A., Capobianchi M., Nicoletti L., Landini M. and Sambri V. (2008). First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 - case report. *Euro Surveill.* 13(41). Pii 19002
7. Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD, Murray KO. (2006). Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet. Microbiol.* 118: 255-259.
8. Zeller HG, Schuffenecker I (2004). West Nile Virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 147-156.

Fig. 1 - Distribuzione mondiale dei virus appartenenti al complesso dell'Encefalite Giapponese.

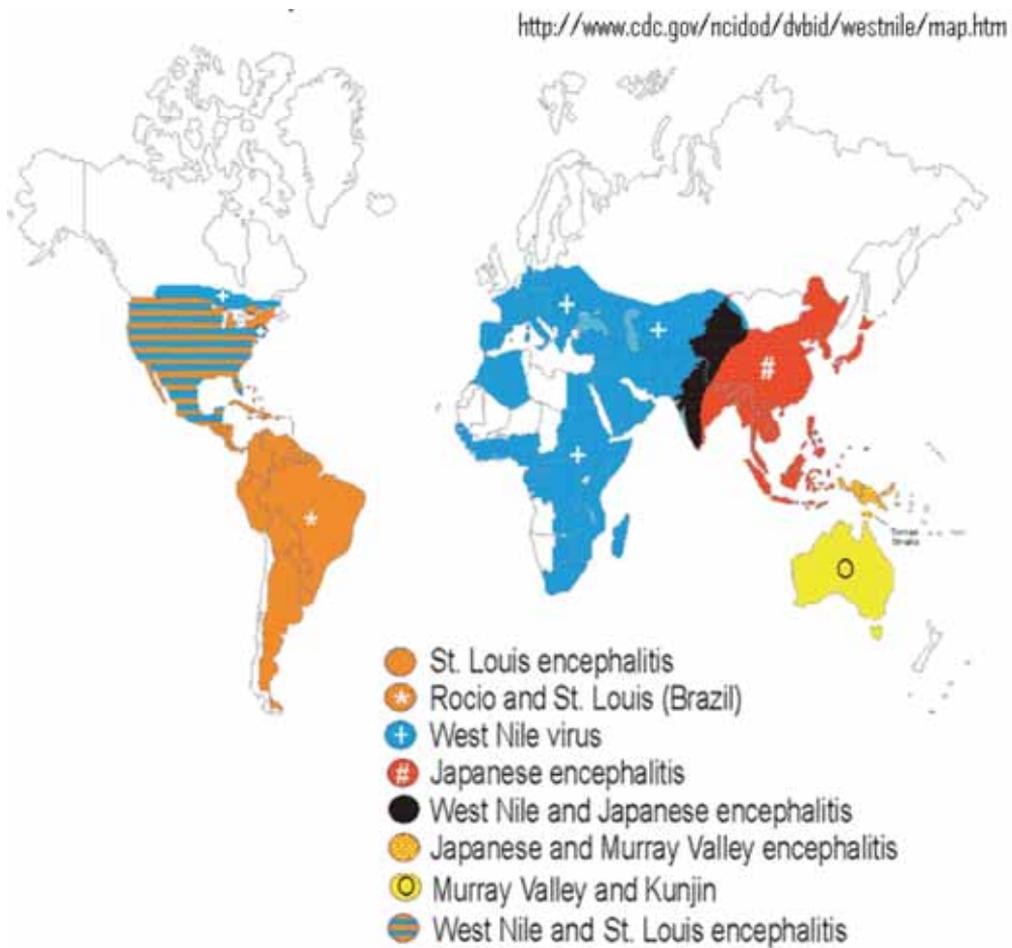


Fig. 2 - Schema del ciclo naturale del WNV

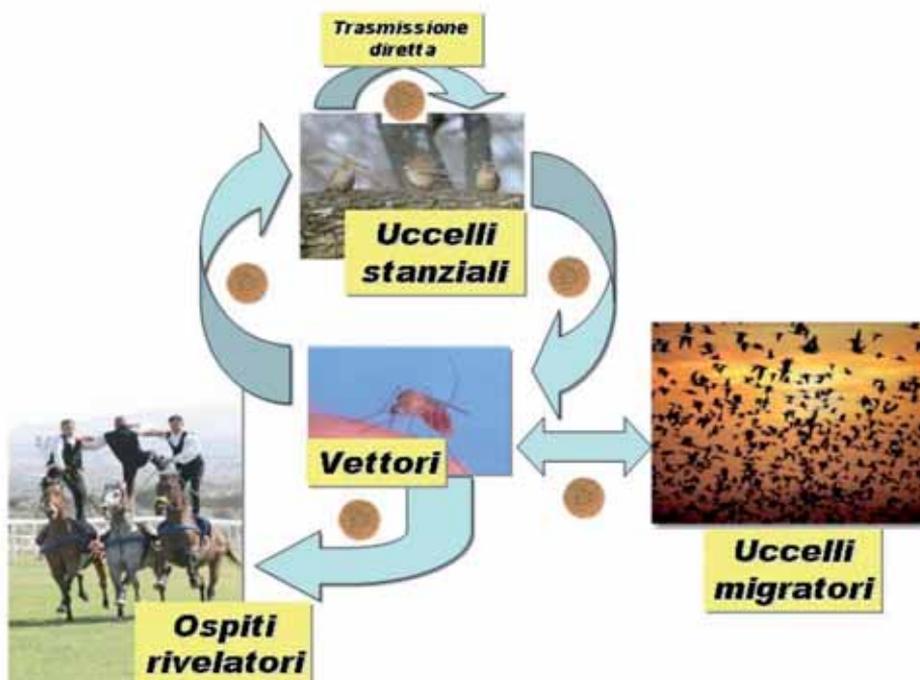
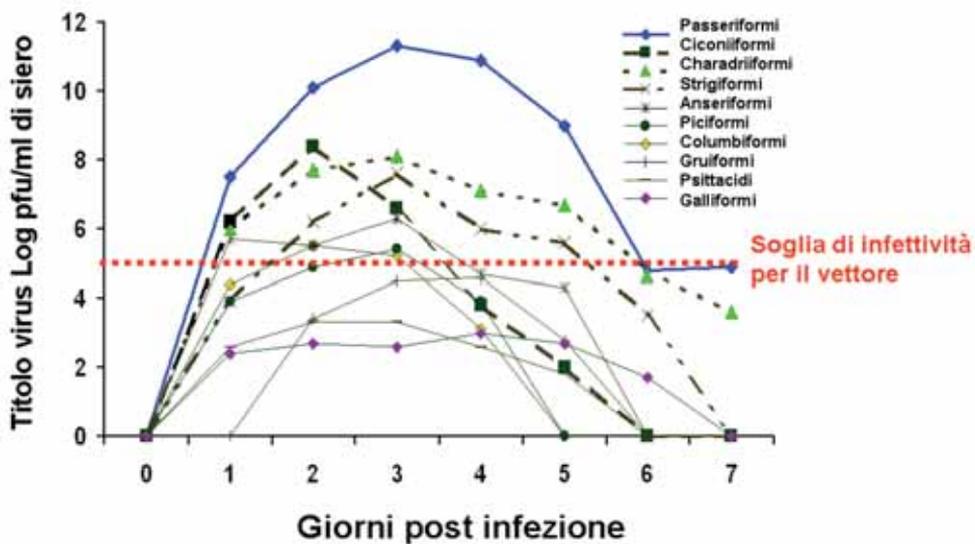


Fig. 3 - Andamento della viremia da WNV in 10 ordini di uccelli (da Komar e coll., 2003).



CONVEGNO

**Micoplasmi e Micoplasmosi:
aggiornamenti su clinica, epidemiologia,
diagnosi e controllo**

Non puoi non notarci



Da sempre conoscenza, applicazione e innovazione rappresentano i segni distintivi di Dox-al. Forti di questa filosofia vincente, ogni giorno creiamo e sviluppiamo nuovi prodotti, tecnologie e servizi adatti ad ogni singola esigenza produttiva.

Una "soluzione su misura" per noi della Dox-al non è un semplice slogan pubblicitario ma, da sempre, lo scopo principale della nostra esistenza... da quarant'anni!

Su Dox-al si può contare, come non notarlo?

dox-al

doxal.com

Dox-al Italia S.p.A.

Via Mascagni, 6 - 20050 Sulbiate (MI) Italy - Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400

MICOPLASMOSI AVIARE: RECENTI DATI SULLA EZIOLOGIA, DIAGNOSI E CONTROLLO

S. H. Kleven

*University of Georgia
Poultry Diagnostic and Research Center
Athens, Georgia 30602-4875*

Traduzione a cura del Prof. G.L. Gualandi

I micoplasmi sono batteri di piccole dimensioni privi di parete cellulare. Hanno genomi molto piccoli, sono resistenti alla penicillina e a tutti gli antibiotici che agiscono inibendo la sintesi della parete cellulare, hanno necessità nutrizionali complesse e sono relativamente sensibili alla inattivazione dalle condizioni ambientali al di fuori dell'ospite. Sono parassiti naturali e la loro infezione tende a persistere nell'ospite per tutta la vita. Molti antibiotici, come le tetracicline, la tilosina, l'eritromicina, i fluorochinoni, la tiamulina ed altri, sono attivi nei riguardi dei micoplasmi ma l'infezione tende a persistere a dispetto di una buona risposta immunitaria e di una efficace terapia antibiotica.

Dagli animali, dalle piante e dagli insetti ne sono state isolate e descritte diverse centinaia di specie. Le infezioni tendono ad essere ospite-specifico; per esempio, le specie umane non sono isolate in natura se non nei primati mentre i micoplasmi aviari non sono generalmente isolati dai mammiferi. Vi sono circa venti specie di micoplasma aviari. Molti sono saprofiti, ma esistono quattro specie che sono generalmente considerate patogene: *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, nei polli e nei tacchini e *M. meleagridis* e *M. iowae* nei tacchini.

Negli Stati Uniti, le azioni al fine del controllo della infezione da *Mycoplasma gallisepticum* (MG), sono iniziate nel 1960, inizialmente come reazione all'alto numero di scarti per areosacculiti osservata dall'USDA nei controlli di ispezione dei polli *post mortem*. In un secondo tempo sono stati aggiunti a questo programma ispettivo anche i controlli per il *M. synoviae* (MS) e il *M. meleagridis* (MN). Da allora sono stati fatti considerevoli progressi nel controllo delle infezioni da *Mycoplasma* nei gruppi di riproduttori di tacchini e dei polli. I programmi di controllo volontario negli USA nei confronti del MG sono gestiti secondo il *National Poultry Improvement Plan*; le indicazioni relative ai prelievi ed agli esami sono riportati nelle loro pubblicazioni ufficiali. La maggior parte degli allevamenti di polli negli S.U. è esente da micoplasmi; tuttavia le infezioni dal MG e dal MS sono ancora comuni negli allevamenti per la produzione commerciale delle uova. Sfortunatamente, nonostante il continuo aumento dei controlli, continuano a verificarsi focolai di malattia. Vi sono stati cambiamenti che hanno portato ad una evoluzione della situazione nel controllo della MG negli Stati Uniti come in tutto il mondo. Questi comprendono cambiamenti nella stessa industria avicola, perfezionamento dei metodi diagnostici, migliore conoscenza degli agenti eziologici e della patogenesi e migliori metodi di controllo.

CAMBIAMENTI NELL'INDUSTRIA AVICOLA CHE INFLUENZANO IL CONTROLLO DELLA INFEZIONE DA MICOPLASMI

Nella maggior parte delle zone, in tutto il mondo, in cui vi è un moderno allevamento avicolo, l'efficacia del controllo dell'infezione da *Mycoplasma* si basa nel mantenere i grup-

pi parentali esenti, mantenendo riproduttori e gli animali in produzioni esenti dalla infezione, utilizzando soggetti della stessa età in allevamenti in cui viene applicata la tecnica del tutto pieno-tutto vuoto e dove i principi di biosicurezza vengono applicati con rigore. In molte parti del mondo ciò ha avuto un notevole successo e la maggior parte dei *broiler*, tacchini e produzione di uova è esente da queste infezioni. Al contrario, le zone con minor sviluppo della industria avicola tendono ad avere notevoli livelli di infezione dal MG e dal MS; ciò genera notevoli problemi ai gruppi industriali che cercano di applicare i metodi moderni di produzione.

Con il rapido sviluppo della produzione avicola in tutto il mondo, vi è stata una concentrazione di un grande numero di volatili in piccole aree e ciò ha aumentato il rischio della esposizione ai micoplasmi patogeni. In diverse aree, la produzione avicola è divenuta così concentrata che, dal punto di vista epidemiologico, l'allevamento è molto simile a quello di soggetti multi-età. Inoltre, il generale miglioramento nel controllo delle malattie ha qualche volta causato la diminuzione della biosicurezza favorendo così le possibilità di diffusione delle infezioni da micoplasma.

Vi è stata la tendenza ad allontanarsi dalla produzione con la tecnologia del tutto pieno-tutto vuoto concentrando la produzione in allevamenti composti di animali di età diversa. Ciò è particolarmente vero per gli allevamenti di produzione commerciale di uova – la maggior parte della produzione di uova negli U.S. avviene oggi in allevamenti con soggetti multi-età, e questa tendenza si sta diffondendo in tutto il mondo. La maggior parte di questi allevamenti sono MS positivi e molti sono anche MG positivi, nonostante i *grandparent* e i *parent* siano quasi sempre esenti da MG e MS.

In diverse zone si può avere l'allevamento di riproduttori pesanti o di *boiler* multi-età. Nella produzione dei tacchini, sta divenendo sempre più frequente la presenza di allevamenti di produzioni a più stadi, in cui sono presenti gruppi di soggetti di due o tre diversi età.

Perciò a dispetto dei notevoli sforzi al fine di mantenere la biosicurezza e l'ampliamento delle conoscenze sulla sopravvivenza dei micoplasmi al di fuori dell'ospite, i focolai di micoplasmosi continuano a verificarsi.

MIGLIORAMENTI NEI METODI DIAGNOSTICI

La base per i programmi di controllo è concentrata sui metodi sierologici come la agglutinazione e l'inibizione della emoagglutinazione, i cui esiti positivi possono essere spesso confermati dall'isolamento dei microrganismi e/o dalla PCR. Più recentemente, stante la disponibilità, *kits* ELISA commerciali sono sempre più spesso utilizzati. Questi *kits* sono molto sensibili e specifici ma, ancora, si possono verificare reazioni aspecifiche. Un notevole miglioramento, per quanto riguarda la specificità dell'ELISA, si è avuto con l'utilizzo di antigeni altamente purificati o con l'uso di *blocking* ELISA utilizzando un anticorpo monoclonale specifico.

I ceppi MG a bassa virulenza inducono una scarsa risposta anticorpale e può essere difficoltoso l'isolamento dai campioni clinici. Ciò può essere particolarmente esatto se il profilo antigenico del ceppo MG coinvolto non ha una buona omologia con i ceppi usati per produrre l'antigene del test. La variabilità dei ceppi e delle risposte cliniche sono state riscontrate anche per il MS.

La reazione a catena della polimerasi (PCR) rappresenta un metodo rapido e sensibile, alternativo ai tradizionali metodi colturali che necessitano di terreni e reagenti specifici e implicano tempi di esecuzione molto lunghi. Negli USA è ampiamente utilizzata una me-

todica PCR sviluppata dal Dr. Lloyd Lauerman della Università di Auburn ma, nel mondo, sono utilizzati molti altri metodi. Noi, attualmente, usiamo una PCR basata sul gene *mgc2*, che permette una identificazione di ceppo preliminare mediante sequenziamento del prodotto amplificato della PCR.

Tali miglioramenti dei metodi sierologici e la rapida identificazione, tramite la PCR, hanno facilitato la rapida ed corretta diagnosi della infezione da MG.

VARIABILITA' TRA E ALL'INTERNO DEI CEPPI DI *M.gallisepticum* e *M. synoviae*

I ceppi MG e MS sono noti per la variabilità in patogenicità e antigenicità. La variabilità patogenetica tra i ceppi MG è nota da molto tempo. Ma esiste anche una significativa variabilità antigenica tra i ceppi MG, che può influire sulla sensibilità delle prove sierologiche in funzione del tipo di ceppo infettante e del ceppo usato per la preparazione dell'antigene. Vi sono, inoltre, significative differenze nella virulenza tra i ceppi di MS. E' stato segnalata l'esistenza di un ceppo di MS isolato dal tacchino che non stimolava alcuna risposta anticorpale anche quando i volatili erano positivi alla cultura. I passeri comuni (*Carpodacus mexicanus*) con congiuntivite da MG sono molto diffusi negli USA. E' stato dimostrato che questo ceppo ha una scarsa diffusione nei polli e che è, per loro, relativamente apatogeno. Un ceppo di MG simile a quello del passero è stato isolato anche dal tacchino con una modica sintomatologia atipica, ma raramente compare nei polli commerciali.

La specifica identificazione dei ceppi MG è importante ai fini della ricerca epidemiologica e per la differenziazione tra i ceppi vaccinali e quelli di campo. Noi abbiamo utilizzato una PCR per il gene *mgc2* e un'altra per la *intergenic spacer region* (IGSR) di MG, seguita dal sequenziamento del prodotto della PCR al fine della specifica identificazione dei ceppi di MG. Una incongruenza tra le sequenze di entrambi i prodotti della PCR sta ad indicare che questi ceppi non sono tra loro corrispondenti; se entrambi i prodotti dei geni *mgc2* e IGSR di due o più ceppi sono allineati, non è prova della loro identità, ma suggerisce solo una elevata probabilità di corrispondenza. Il maggior vantaggio di questo metodo è che può essere eseguito direttamente su campioni clinici senza la preventiva necessità di avere i ceppi in cultura pura. Tutto ciò permette inoltre lo sviluppo di una database cosicché i confronti possono essere fatti con ceppi di archivio. Utilizzando questo metodo siamo stati in grado di identificare con maggior precisione le differenze esistenti tra ceppi vaccinali e di campo. Una simile identificazione dei ceppi specifici di MS non si può fare con il risultato della PCR del gene *vlhA*.

Gli studi basati sull'uso di *Western blots* e anticorpi monoclonari hanno evidenziato una notevole variabilità nella espressione degli antigeni di superficie tra i ceppi di MG; molte di queste proteine sono espresse in modo variabile. Ciò ha comportato un notevole impegno nella caratterizzazione della variabilità di espressioni degli antigeni di superficie. Altri studi hanno dimostrato che in vivo avviene anche una variazione di fase. E' stato dimostrato che una simile variabilità della espressione antigenica di superficie si verifica anche tra i ceppi di MS. Per esempio, i cloni di MS negativi alla emoagglutinazione, sono meno virulenti di quelli positivi alla emoagglutinazione. Il significato di questa variabilità nella espressione degli antigeni di superficie non è ancora ben noto; tuttavia, sembra logico pensare che possa avere un ruolo nella patogenesi, nella risposta sierologia, e nella evasione del sistema immunitario dell'ospite.

Food for professionals



HUVEPHARMA®

Add performance to your business



Huvepharma NV - Uitbreidingstraat 80 - 2600 Antwerp - Belgium

Tel.: +32 3 288 1849 - Fax: +32 3 289 7845

e-mail: customerservice@huvepharma.com

Per l'Italia: paolo.schiavi@huvepharma.com

www.huvepharma.com

VACCINAZIONE PER *M.gallisepticum*

Con l'avvento degli allevamenti di galline commerciali multi-età, il controllo con la vaccinazione è divenuto un valido metodo di controllo alternativo.

Il primo vaccino commerciale in uso per il MG era composto da corpi batterici inattivati, emulsionati in olio. Proteggeva bene contro la aerosacculite e dalla caduta di produzione delle uova, ma proteggeva poco nei riguardi della colonizzazione dei ceppi di campo del MG e, di conseguenza, non poteva essere utilizzato nei programmi di eradicazione. I maggiori svantaggi nell'uso di questo tipo di vaccino erano che, oltre ai costi per la somministrazione, per avere una buona protezione immunitaria, dovevano essere praticati due interventi vaccinali.

I vaccini vivi per il MG comprendono: il vaccino ceppo F, utilizzato per molto tempo da diversi produttori di vaccini; il vaccino ceppo 6/85 della Intervet America ed il vaccino allestito con il ceppo ts-11, sviluppato e ampiamente usato in Australia.

Il vaccino preparato con il virus ceppo F ha una virulenza medio-bassa per i pulcini (lo stesso era patogeno per il tacchino), colonizza efficientemente il tratto superiore dell'apparato respiratorio, si diffonde in modo relativamente lento da gruppo a gruppo e protegge dalla caduta di produzione di uova. Determina una eccellente protezione nei riguardi della colonizzazione di ceppi usati per il challenge e sostituisce i ceppi patogeni di campo presenti negli allevamenti multi-età di produzione commerciale delle uova. Purtroppo il ceppo F è stato responsabile di infezioni di campo nei tacchini commerciali.

I ceppi 6/85 e ts-11 hanno alcuni vantaggi nei riguardi del ceppo F. Entrambi dimostrano protezione all'infezione di *challenge*, mentre sono apatogeni e hanno una capacità molto limitata nella diffusione tra gli animali, così da presentare minor rischio per i gruppi avicoli confinanti con gli allevamenti dove si vaccina. Il ceppo F ha una migliore capacità nel sostituirsi ai ceppi *challenge* negli allevamenti utilizzati per le prove sperimentali rispetto ai ceppi 6/85 e ts-11 e, esperienze di campo in allevamenti commerciali di ovaiole suggeriscono che il ceppo ts-11 è in grado di sostituire il ceppo F negli allevamenti commerciali multi-età. Dopo l'interruzione della vaccinazione con il ceppo ts-11 il gruppo si è conservato MG *free*. Dati simili per il ceppo 6/85 non sono disponibili, ma vi sono allevamenti, che hanno utilizzato il ceppo 6/85 e che ora sono sieronegativi a suggerire il fatto che l'eliminazione dei ceppi di campo è possibile anche con il ceppo 6/85. Noi abbiamo constatato, in allevamenti commerciali, situazioni in cui i ceppi 6/85 o ts-11 non hanno dimostrato resistenza al *challenge* di campo. Se i ceppi di campo sono molto virulenti, può essere necessario vaccinare con il ceppo F per uno o più cicli produttivi al fine di eliminare il ceppo selvaggio dall'allevamento. A questo punto è possibile ritornare alla vaccinazione o con il ceppo 6/85 o ts-11, oppure può sembrare ragionevole continuare con il ceppo F.

Una notevole preoccupazione nell'uso del vaccino vivo per il MG è la sicurezza. Nei tacchini si sono verificati numerosi episodi di patologia respiratoria causati dall'uso del ceppo vaccinale F "escaped"; anche se è molto efficace nella vaccinazione per i polli, questo ceppo vaccinale non dovrebbe essere utilizzato quando vi è il potenziale pericolo di diffusione nei tacchini. Non siamo a conoscenza di episodi di infezioni, nei polli, causate dal ceppo vaccinale F "escaped". Vi sono stati parecchi casi di isolamento di ceppi di MG 6/85-like dal tacchino con una sintomatologia clinica della malattia. In alcuni casi vi era una anamnesi di vaccinazione di polli e tacchini in allevamenti vicini. Recentemente vi è stato l'isolamento di ceppi di MG 6/85-like in allevamenti commerciali di ovaiole non vaccinati vicini ad allevamenti di animali vaccinati con 6/85. Il ceppo ts-11 è stato riscontrato in almeno due occasioni in gruppi di polli non vaccinati. In entrambi i casi vi è una

anamnesi riguardante un possibile uso di attrezzature per la vaccinazione contaminate e in uno di questi casi una successiva disseminazione agli allevamenti di riproduttori confinanti. E' anche noto che il ceppo ts-11 può trasmettersi dai maschi vaccinati alle femmine riproduttrici non vaccinate. Queste esperienze stanno a suggerire che, nonostante i nuovi vaccini siano molto sicuri, hanno un potenziale di eliminazione e la loro sicurezza dovrebbe essere valutata molto attentamente prima di decidere l'intervento vaccinale. Una importante regola nell'uso di questi vaccini è che si dovrebbero utilizzare vaccini con un alto titolo, somministrati in modo appropriato e corretto al fine di garantire un'assunzione ottimale da parte degli animali e minimizzare la possibile diffusione del ceppo vaccinale da volatile a volatile.

I vaccini per il MG sono stati utilizzati meno nei tacchini. Il ceppo F è troppo patogeno per essere usato nel tacchino, mentre il ceppo 6/85 può avere un possibile uso in circostanze molto limitate. In una nostra prova vaccinale, la somministrazione del vaccino 6/85 o del vaccino ts-11 non hanno originato, nei tacchini, sintomatologie respiratorie o lesioni anatomico-patologiche. A seguito di un challenge per aerosol con dosi elevate si è avuta una resistenza modica o assente nei riguardi della areosacculite, mentre vi è stata protezione verso le lesioni delle vie aeree superiori. Il ceppo ts-11 sembra avere una limitata capacità di infezione per il tacchino.

In esperienze di campo con utilizzo di vaccini vivi, questi hanno fornito risultati positivi negli allevamenti commerciali di ovaioio. Simili risultati positivi si sono avuti anche vaccinando riproduttori pesanti multi-età. Queste esperienze suggeriscono che i vaccini vivi possono essere un mezzo efficace per l'eradicazione della infezione da MG negli allevamenti avicoli commerciali multi-età.

In confronto il lavoro fatto sui vaccini MS è relativamente. E' stato registrato un vaccino inattivato per MS negli USA che però è stato poco impiegato nella pratica in campo. Un ceppo termosensibile MS è stato registrato in Australia, ed ora è ampiamente utilizzato in quel Paese. E' stato registrato in Messico ed anche in altri Paesi, ma non è disponibile negli USA

Nonostante l'uso dei vaccini nei riguardi della infezione da MG, la maggior parte dei settori della nostra industria avicola è impegnata nella strategia, a lungo termine, della conservazione *free* dei loro allevamenti dalle infezioni da MG e da MS.

DIAGNOSI DIRETTA E INDIRETTA E IDENTIFICAZIONE DI *MYCOPLASMA* SPP.

Giovanni Tosi¹, Salvatore Catania²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Sezione Diagnostica di Forlì.

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Area Diagnostica di Padova.

INTRODUZIONE

Esistono circa 120 specie appartenenti al genere *Mycoplasma*. Oltre 20 di queste possono infettare le specie aviari. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) hanno la maggiore importanza patogena in varie specie, mentre *Mycoplasma meleagridis* (MM) e *Mycoplasma iowae* (MI) sono rilevanti per il tacchino. *Mycoplasma imitans*, correlato antigenicamente con MG, provoca patologie respiratorie in alcune specie tra cui la pernice rossa (*Alectoris rufa*) e lievi forme respiratorie in pollo e tacchino. *Mycoplasma gallinarum* e *Mycoplasma gallinaceum* sono tra le specie più frequentemente isolate. Il loro significato patogeno è tuttavia modesto. La diagnosi di laboratorio delle micoplasmosi si basa sull'isolamento e identificazione del *Mycoplasma* (diagnosi diretta) e sul rilevamento della risposta anticorpale (diagnosi indiretta o sierologica). In questi ultimi anni hanno inoltre avuto un forte impulso le metodiche di biologia molecolare (PCR e real-time PCR). La scelta del metodo diagnostico va fatta in funzione dell'obiettivo che ci si prefigge (programmi di monitoraggio nei riproduttori, scambi commerciali, conferma del sospetto clinico e anatomo-patologico).

DIAGNOSI DIRETTA

Si basa sull'esame colturale con successiva identificazione del ceppo isolato. La possibile presenza di differenti specie di micoplasmi su di uno stesso campione rende consigliabile un successivo reisolamento delle colonie (clonazione) che nel caso dei micoplasmi risulta essere particolarmente laborioso. Naturalmente è importante sottolineare che dal punto di vista diagnostico tale tipologia di approccio è consigliata in tutti quei casi in cui non si dispone di metodiche di biologia molecolare atte a diagnosticare la specie di micoplasma sospettata e in tutti quei casi in cui occorre possedere il ceppo isolato per ulteriori indagini diagnostiche. Rimane infine da ricordare l'elasticità di utilizzo dei terreni colturali che, rispetto ad altre metodologie, possono permettere l'isolamento di differenti specie di micoplasmi, anche se nessun terreno garantisce l'isolamento di tutte quelle di interesse veterinario.

I micoplasmi sono microrganismi esigenti ed in generale i terreni di coltura solitamente utilizzati si basano su un medium colturale arricchito con siero ed estratto di lievito. Le specie di micoplasmi di interesse aviario sono oltre 20. Tra loro quelle di rilevante ruolo patogeno manifestano una crescita lenta (*M. synoviae* e *M. gallisepticum* 3-5giorni, *M. iowae* almeno 1 settimana) mentre alcune di quelle non considerate patogene presentano una velocità di crescita maggiore (*M. gallinaceum* e *M. gallinarum* 24-48 ore) tendendo a sovrastare le precedenti in coltura. Alcune specie presentano inoltre alcune caratteristiche esigenze di coltura come ad esempio il *Mycoplasma synoviae* che richiede per la sua crescita la presenza di NAD e cisteina.

Il terreno di coltura deve fornire i nutrienti e l'energia necessari per la crescita dei microrganismi; deve inoltre permettere la crescita selettiva dei micoplasmi; a tal fine sono aggiunte sostanze come penicillina ed acetato di tallio il cui ruolo è quello di inibire la crescita di microrganismi non desiderati. Per i micoplasmi aviari terreni quali il Frey (in genere utilizzato) ed il PPLO con successive modifiche possono rappresentare un buon compromesso di semplicità di utilizzo e performance; sono anche disponibili terreni commerciali.

L'approccio diagnostico microbiologico nei confronti dei micoplasmi comprende diverse fasi quali il prelievo, la semina, l'isolamento e l'identificazione. A differenza degli altri batteri non è invece disponibile di routine il test di sensibilità agli antibiotici.

Ognuna delle fasi precedentemente indicate presenta alcune particolarità che verranno di seguito descritte, anche è sempre bene ricordare che nessuna metodica di laboratorio può migliorare un cattivo prelievo.

Per quanto concerne il campionamento in allevamento bisogna segnalare che durante il periodo acuto la presenza di micoplasmi nel tratto respiratorio superiore è elevata così come la prevalenza in allevamento, ciò permette di campionare, mediante tamponi tracheali, un modesto numero di animali (10-20), mentre nelle fasi in via di cronicizzazione il numero di animali da campionare deve essere maggiore (>30).

Il mezzo di trasporto deve per quanto possibile evitare la crescita di microrganismi non desiderati e non interferire con la vitalità dei micoplasmi. A tal fine è consigliato stemperare i tamponi in appositi medium (simili ai terreni di coltura) contenenti agenti antibatterici, quali per esempio la penicillina. Tale tipologia di campione deve essere trasportato preferibilmente a temperatura di refrigerazione anche se è tollerato il trasporto a temperatura ambiente. Per quanto riguarda porzioni organiche e essudati prelevati in allevamento questi dovranno essere trasportati a temperatura di congelamento.

Il campione inviato al laboratorio per ricerca micoplasmi mediante isolamento è rappresentato in genere da tamponi tracheali, anche se è possibile utilizzare altri campioni quali, sacchi aerei, essudati/trasudati (liquidi articolari), tamponi cloacali o fallici ed il sacco vitellino. I micoplasmi tendono a scomparire dalle lesioni in poche settimane ma rimangono più a lungo nelle vie aeree superiori. I campioni sono inoculati in brodo (3-5 ml). Un eccesso di inoculo ha effetti inibitori sulla crescita e per tale motivo è opportuno eseguire diluizioni scalari dell'inoculo. I campioni possono essere prelevati anche da soggetti deceduti ed in buono stato di conservazione. Sempre risulta fondamentale la sterilità del prelievo ed il tipo di campionamento. Per quanto riguarda gli essudati, bisogna tener conto della possibile presenza di anticorpi che possono causare inibizioni della crescita. Infine per le uova incubate il prelievo ottimale è rappresentato dal sacco vitellino in prossimità del 18° giorno di incubazione per il pollo e proporzionalmente per le altre specie.

Sebbene sia possibile utilizzare anche porzioni di tessuto risulta opportuno per tale tipo di prelievo focalizzare l'attenzione nella quantità di inoculo, poiché la lisi cellulare provoca la liberazione di enzimi che alterano il pH del medium e quindi il rendimento del terreno, senza peraltro dimenticare il potenziale effetto inibitore proprio dei tessuti. Nel campionamento si deve tener conto anche di eventuali trattamenti antibiotici che potrebbero inibire la crescita dei micoplasmi, se necessario anche in questo caso è consigliata la diluizione dell'inoculo. E' possibile anche la semina del campione direttamente su piastre di terreno agarizzato. Anche se tale approccio rappresenta un buon

compromesso in termini di tempo, è bene ricordare che il terreno liquido presenta sempre una maggiore sensibilità. L'incubazione avviene a 37°C in condizioni di microaerofilia 5% CO₂, con un'umidità relativa elevata.

Una volta incubati i brodi dovranno essere controllati giornalmente per evidenziare sospetto di crescita (acidificazione e torbidità). Il pH acido risulta essere tossico per i micoplasmi ed in particolare per *Mycoplasma synoviae*. Quando il brodo cambia colore, la procedura prevede la semina su piastra ed un nuovo passaggio in brodo, per mantenere vitale la coltura. In caso il brodo non presenti segni di crescita comunque si effettua il passaggio dopo 7 giorni. Le piastre potranno essere osservate ogni 2-3 giorni per valutare la presenza di colonie.

Colonie piccole, lisce con un diametro variabile a seconda della specie (da quasi invisibili a 1 mm), con centro rilevato devono essere considerate sospette e sulla base di ciò si deve intraprendere l'identificazione. Rispetto alla batteriologia classica nei micoplasmi le prove biochimiche sono scarsamente utilizzate. Al fine di identificare le colonie sono utilizzati diversi metodi quali: l'immunofluorescenza (IF) su colonie, l'immunoperoxidasi su colonie e l'inibizione della crescita con antisieri specifici.

Le prime due tecniche sono piuttosto rapide (< 24 ore), si basano sulla reazione tra antisieri specifici; questi ultimi possono essere direttamente coniugati con dei fluorocromi, oppure possono essere fatti reagire con un altro anticorpo (secondario) coniugato con fluorocromi o con perossidasi. Il legame tra antisiero specifico e colonia sospetta viene evidenziato attraverso microscopio a fluorescenza per IF e mediante microscopio ottico nel caso dell'immunoperoxidasi.

L'inibizione della crescita richiede tempi maggiori, ma è di semplice applicazione basandosi sul fatto che antisieri specifici inibiscono la crescita delle colonie omologhe e pertanto non sono richieste attrezzature particolari.

La complessità, difficoltà e durata di isolamento hanno reso particolarmente idonee e necessarie metodiche biomolecolari che offrono nuove possibilità di identificazione in tempi molto brevi.

DIAGNOSI INDIRETTA o SIEROLOGICA

Le prove sierologiche usate routinariamente dai laboratori includono la sieroaagglutinazione rapida (SAR), le metodiche immunoenzimatiche (ELISA) e l'inibizione della emoagglutinazione (HI). Non esistono metodiche sierologiche nei confronti di *Mycoplasma iowae*, la cui diagnosi si basa pertanto sull'isolamento del microrganismo o su metodiche di biologia molecolare (PCR).

SIEROAGGLUTINAZIONE RAPIDA (SAR): viene eseguita nei confronti di MG, MS e MM. Si applica su siero e tuorlo. Si tratta di una metodica rapida, molto sensibile e poco costosa. Consente di rilevare i cosiddetti "anticorpi precoci" (IgM) che compaiono dopo 5-7 giorni dall'infezione (i dati si riferiscono a infezioni sperimentali, mentre in condizioni di campo la cinetica della produzione anticorpale può essere soggetta a variazioni). Le positività alla SAR diminuiscono dopo 2-3 mesi dall'infezione e persistono per circa 6 mesi. La SAR è considerata una prova di screening. I campioni positivi devono essere infatti confermati impiegando metodiche più specifiche (ELISA, HI). La prova può dar luogo a reazioni falsamente negative soprattutto nei casi seguenti:

- Infezione precocissima.
- Infezione di lieve entità.
- Gruppo sotto trattamento antibiotico.
- Siero "vecchio" (oltre 5-6 giorni dal prelievo).

- Siero congelato.
- Siero emolitico.

Ben più frequenti sono le reazioni falsamente positive che si possono verificare nelle situazioni seguenti:

- Infezione da altri micoplasmi: è possibile una reazione crociata tra l'antigene MG e gli anticorpi prodotti nei confronti di MS, mentre non si verifica la situazione inversa.
- Infezione da *Mycoplasma imitans* (può causare reazioni crociate con l'antigene MG).
- Infezione da altri microrganismi (stafilococchi, *Pseudomonas* spp.).
- Somministrazione di vaccini inattivati con adiuvante oleoso (in questi casi la reazione falsamente positiva persiste in genere per 4-6 settimane e può arrivare fino a 10 settimane post-vaccinazione).
- Somministrazione di vaccini prodotti su linee cellulari (la reazione falsamente positiva è legata alle proteine del siero fetale aggiunto al terreno di crescita della coltura cellulare).
- Somministrazione di vaccini batterici (come ad esempio il vaccino nei confronti della corizza infettiva).
- Autoagglutinazione dell'antigene: per evitare questo inconveniente il laboratorio deve includere nella prova appropriati controlli di qualità.

Per ridurre il problema delle reazioni falsamente positive si consiglia di ripetere il prelievo dopo circa 7 giorni (in caso di infezione si osserverà un incremento del numero dei campioni positivi) oppure di ripetere il prelievo dopo circa 15 giorni impiegando anche metodiche più specifiche (ELISA, HI). Un'altra opzione consiste nell'inattivazione (a 56°C per 30 minuti) e nella diluizione dei sieri in esame. In questo caso si considera come valore-soglia la diluizione 1:10. Questo approccio può tuttavia mascherare deboli risposte anticorpali così come infezioni in fase iniziale (la positività compare infatti 14 giorni post-infezione da MG e 21 giorni post-infezione da MS).

METODICHE IMMUNOENZIMATICHE (ELISA): sono numerosi i test ELISA attualmente in commercio nei confronti di MG, MS, MM. La metodica è applicabile su siero e tuorlo rileva principalmente le IgG che compaiono, dopo infezione sperimentale, tra 7 e 21 giorni post-infezione. Sono possibili, in gruppi di galline ovaiole a fine ciclo, reazioni aspecifiche legate a proteine sieriche.

INIBIZIONE DELLA EMOAGGLUTINAZIONE (HI): è considerata la metodica diagnostica dotata di maggiore specificità. Viene perciò impiegata solo per confermare positività ottenute con altre prove sierologiche (SAR, ELISA). Si tratta di un test difficilmente standardizzabile in quanto prodotto e validato da ogni singolo laboratorio. Di conseguenza i risultati che si ottengono sono difficilmente confrontabili tra laboratori diversi. Rileva esclusivamente le IgG (prodotte dall'animale dopo 3-6 settimane dall'infezione). Nell'interpretazione dei risultati si considera in genere come valore-soglia un titolo di 1:40. Tuttavia titoli di 1:20 possono essere prodotti da un'infezione in fase iniziale o da ceppi scarsamente immunogeni. Un titolo di 1:80 è indice di sicura positività. Il limite principale di questa metodica è legato proprio alla sua elevata specificità che può dar luogo a reazioni falsamente negative in caso di infezioni sostenute da ceppi di *Mycoplasma* spp. scarsamente correlati dal punto di vista antigenico con il ceppo impiegato nell'allestimento della prova.

RISPOSTA SIEROLOGICA AI VACCINI VIVI ATTENUATI NEI CONFRONTI DI *Mycoplasma gallisepticum*: nel nostro paese è diffuso l'utilizzo, nelle galline ovaiole da consu-

mo, di vaccini vivi attenuati per il controllo dell'infezione da MG. I ceppi vaccinali registrati attualmente sono il ts-11 e il 6/85 e vengono somministrati in fase di pollastra. Il ceppo 6/85 è rilevabile nella trachea dei soggetti vaccinati per alcune settimane, mentre il ceppo ts-11 persiste per tutto il ciclo di ovodeposizione. La risposta sierologica nei confronti del ceppo 6/85 è praticamente assente. Il ceppo ts-11 induce una risposta anticorpale rilevabile mediante SAR ed ELISA. La risposta al test HI è invece piuttosto variabile.

INDAGINI SIEROLOGICHE NELLA PROGENIE: è di uso comune il controllo sierologico dei pulcini all'accasamento per verificare l'assenza di anticorpi materni nei confronti di MG e MS. I programmi di monitoraggio possono anche prevedere il controllo delle uova non incubate. Gli anticorpi materni vengono trasferiti nel tuorlo con livelli simili a quelli dei riproduttori ma "ritardati" di 5-6 giorni (il tempo richiesto per la formazione dell'uovo). Nel tuorlo vengono trasferite le IgG e, in piccola parte, le IgM. Queste ultime sono contenute soprattutto nell'albume. Per questo motivo per valutare la presenza di anticorpi materni nelle uova non incubate si consiglia l'impiego della metodica ELISA, mentre la SAR va usata con una certa cautela. Gli anticorpi materni passano dal sacco vitellino al sangue del pulcino negli ultimi 5-6 giorni di incubazione e raggiungono il picco a 2 giorni di vita. In assenza di infezione gli anticorpi materni vengono catabolizzati dal pulcino nell'arco di 15-18 giorni. Questo declino è rapido soprattutto tra 4 e 8 giorni di vita. In presenza di trasmissione verticale dell'infezione la progenie comincia a produrre attivamente anticorpi nel corso della prima settimana di vita. Tale produzione raggiunge il picco tra 4 e 6 settimane di età.

DIAGNOSI MEDIANTE PCR

la metodica PCR ("reazione a catena della polimerasi") è ormai ampiamente diffusa nella diagnosi dell'infezione da micoplasmi. Con questa tecnica si rileva la presenza del DNA del microrganismo nel campione in esame. Rispetto all'isolamento la PCR presenta una maggiore rapidità e sensibilità. Rispetto alla diagnosi sierologica la PCR consente di rilevare l'infezione anche nelle sue fasi iniziali. Sono numerosi i protocolli di reazione descritti in letteratura. Nella diagnosi di MG la maggior parte delle reazioni mediante PCR amplifica il gene che codifica per l'RNA ribosomiale 16S. In altri casi il gene "bersaglio" codifica per proteine di superficie (mgc2, LP, gapA). La metodica PCR viene applicata nei casi seguenti:

Programmi di monitoraggio nei riproduttori: viene attuato mediante la periodica (ad esempio ogni 15 giorni) esecuzione di tamponi tracheali (per MG e MS) e cloacali (per MM e MI). E' importante eliminare i tamponi sporchi di sangue o di alimento. I prelievi vanno mantenuti in stato di refrigerazione fino alla consegna al laboratorio per evitare la lisi del DNA. In assenza di segni clinici è fondamentale la numerosità del campione al fine di aumentare le probabilità di rilevare l'infezione. In funzione del livello di prevalenza (ipotizzato) dell'infezione e del livello di confidenza (probabilità di rilevare almeno 1 soggetto positivo in caso di infezione) il numero di campioni consigliato è riportato nella tabella seguente:

Prevalenza ipotizzata	5%	5%	20%	20%
	SEGNI CLINICI ASSENTI		SEGNI CLINICI LIEVI	
Dimensioni del gruppo	5000-10000	5000-10000	5000-10000	5000-10000
Livello di confidenza	95%	99%	95%	99%
Numero di tamponi	60	90	15	20

Controllo dell'infezione nella progenie: viene eseguita a partire dal sacco vitellino in uova embrionate o pulcini di 1 giorno di vita. Il limite di questo controllo è legato alla notevole variabilità della trasmissione verticale dei micoplasmici da parte dei riproduttori infetti.

Conferma del sospetto clinico e/o anatomo-patologico: in questo caso la PCR viene eseguita a partire da campioni patologici prelevati in sede autoptica.

Monitoraggio ambientale: è possibile rilevare la presenza del DNA dei micoplasmici a partire da tamponi ambientali e polveri.

METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DI CEPPI VACCINALI

Nel settore delle galline ovaiole da consumo è importante poter differenziare i ceppi vaccinali (ts-11 e 6/85) dai ceppi di campo. A tale riguardo sono state descritte numerose metodiche: RFLP ("restriction fragment length polymorphism"), ribotipizzazione e RAPD ("random amplified polymorphic DNA"). Tuttavia l'applicazione pratica di queste tecniche è limitata dalla necessità di disporre di colture pure del ceppo da identificare. Una possibile alternativa è data dal sequenziamento di determinati tratti del DNA del microrganismo. Si tratta tuttavia di una metodica costosa soprattutto se applicata ad un elevato numero di campioni. Più recentemente è stata descritta una metodica che consente la differenziazione dei ceppi vaccinali da quelli di campo mediante una semplice PCR.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Evans J.D.: *Differentiation of Mycoplasma gallisepticum vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used Mycoplasma gallisepticum challenge strains by PCR*. Avian Diseases 2008, vol.52 pp.491-497.

Feberwee A. et al.: *Comparison of culture, PCR and different serologic tests for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae infections*. Avian Diseases 2005, vol.49 pp.260-268.

Ferguson N.M. et al.: *Use of molecular diversity of Mycoplasma gallisepticum by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies*. Microbiology 2005, vol.151 pp.1883-1893.

Garcia M.C. et al.: *Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens*. Avian Diseases 2005, vol.49 pp.125-132.

Kempf I. Et al.: *Comparison of serological tests for detection of Mycoplasma gallisepticum antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens*. Veterinary Microbiology 1998, vol.60 pp.207-213.

Kleven S.H. et al.: *Serological responses of chickens to low challenge doses of Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases 2007, vol.51 pp.738-743.

Levisohn S. et al.: *Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum)*. Rev.Sci.Tech.Off. Int.Epiz. 2000, vol.19 pp.425-442.

Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Volume II. Diagnostic procedures. Edited by Joseph G. Tully and Shmuel Razin. Academic Press 1996.

Mycoplasma protocols. Edited by Roger Miles and Robin Nicholas. Humana press 1998.

Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by David E Swayne, John R Glisson, Mark W Jackwood, James E Pearson and Willie M Reed. Published by The American Association of Avian Pathologists.

IL CONTROLLO DELLE MICOPLASMOSI AVIARI CON LA VACCINAZIONE

Chris Morrow, PhD BVSc

Bioproperties Ltd, Ringwood, Victoria, Australia

Traduzione a cura di G.L. Gualandi e A. Lavazza

Liberi dai micoplasmosi – il desiderio e la realtà

Gli effetti insidiosi delle infezioni da micoplasmi patogeni per i polli sono aumentati con lo sviluppo dei moderni metodi di allevamento e produzione. Il controllo dei patogeni oro-fecali con l'allevamento in gabbia e con l'uso dei coccidiostatici ha dato origine ad un notevole aumento delle dimensioni dei gruppi e della densità negli allevamenti, rendendo più evidenti e prevalenti i quadri patologici riferibili a micoplasmosi. Infezione cronica e la trasmissione verticale, sono le caratteristiche peculiari delle infezioni da micoplasma che non sono in alcun modo condizionate o intaccate dalla applicazione di misure di biosicurezza, viceversa efficaci per altri patogeni. Si è così iniziato a comprendere che la malattia asintomatica era responsabile di perdite economiche (da 10 a 20 uova per ovaio/anno e riduzione dell'indice di conversione con ceppi di MG) e che poteva essere fonte di infezione per la progenie e per altri gruppi.

Negli anni '60 e '70 è stata dimostrata la possibilità di eradicare le micoplasmosi dagli allevamenti aviari. Gli allevamenti industriali di galline ovaiole e di broilers, quindi, misero in atto tale strategia su larga scala con un considerevole successo particolarmente a livello delle linee pure di riproduttori. In assenza di trasmissione verticale ciò ha dato la possibilità ai produttori di filiera di provare a percorrere la via dell'eradicazione da micoplasma, che è stato raggiunto in diverse zone con differenti livelli di successo.

I gruppi di riproduttori da carne, ad esempio, sono stati mantenuti esenti da MG in diverse zone mediante la rimonta con animali esenti dall'infezione, mantenendoli tali mediante l'applicazione di misure di biosicurezza ed eliminando i gruppi di soggetti che via via si infettavano. Il monitoraggio è estensivo e costoso mentre la biosicurezza ha evidenziato diversi altri vantaggi. Talvolta i manager della produzione avicola tentano di controllare i gruppi di animali infetti da micoplasma, o la loro progenie ed allora dovranno incrementare e applicare specifiche norme di biosicurezza ed usare anche la terapia antibiotica o altre strategie antimicoplasma (trattamento termico prima della incubazione). Queste sono scelte dispendiose se si considera: il costo degli antibiotici nei gruppi di animali infetti, il trattamento delle uova (dipping o inoculazione), il trattamento dei pulcini durante la prima settimana di vita seguito poi da un ulteriore intervento intorno ai 21 giorni per i broilers, l'aumento della mortalità embrionale e dei broilers, per non parlare poi della organizzazione per l'attuazione di tali interventi in una logica di produzione quale è quella della filiera integrata. Anche l'antibiotico resistenza può essere un problema. Il mantenimento di gruppi di animali infetti può aumentare il rischio che altri gruppi di polli all'interno di una medesima filiera produttiva si possono infettare.

Il controllo del MS non è stato così universalmente applicato. Sicuramente nelle grandi industrie delle ovaiole il MS è spesso ritenuto di un'importanza relativa (salvo che non siano presenti ceppi che inducono sinovite) nonostante gli esperti sostengano che si tratta di un'infezione importante sul piano economico. Frequentemente l'infezione da MS non è neanche ricercata e per ciò non è nota la sua incidenza (non so come possa avere senso eseguire delle indagini sierologiche per MG senza eseguire, in parallelo, la prova nei riguardi del MS). In realtà penso che i veterinari locali tendano a sottovalutare il costo dell'infezione da MS in quanto essa è spesso controllata tramite la somministrazione routinaria di antibiotici ai gruppi di ovaiole. Recenti

ricerche hanno evidenziato come MS giochi un ruolo determinante nel causare fragilità delle uova e peritoniti. Anche negli allevamenti di broilers è spesso non considerato a sufficienza o del tutto ignorato - è descritta un'incidenza del 10% negli allevamenti di riproduttori pesanti in Olanda nel 2005-6 (Febewee et al., 2008) - e in diverse zone l'infezione è controllata, ancora una volta, mediante terapia antibiotica di routine.

E' nota una notevole variazione tra i ceppi per quanto riguarda la patogenicità, da ceppi associati alla sinovite a ceppi che causano perdite non superiori a 5 uova/anno (quantunque un'aumentata eliminazione dal consumo di broilers al macello possa essere l'unico effetto tangibile). Non ci sono molti dati in letteratura che riportano di cali dell'ovodeposizione, quando l'infezione da MS colpisce le ovaiole, ma questa è viceversa una situazione ben nota dai veterinari pratici. Nel Regno Unito non si procede sempre alla distruzione dei gruppi di riproduttori di broilers infetti da MS; ma, soprattutto se vi è carenza di uova da incubazione si procede con l'applicazione di misure di biosicurezza e con i trattamenti antibiotici. Poiché le aziende di ovaiole sono in molti siti di produzione ancora composte da gruppi multi-età, si ritiene che questa situazione possa rappresentare un elevato rischio ed una fonte di trasmissione dell'infezione alle aziende di riproduttori situate nelle vicinanze.

I ceppi MS sembrano inoltre in grado di infettare per aerosol a distanze maggiori di quanto non facciano i ceppi MG. Ad esempio, aziende di granparentali con capannoni tra loro distanti circa 400 metri come prescritto nel vecchio manuale Arbor Acre possono restare esenti da MG mentre hanno molti più problemi con MS. Non sono note le ragioni di tale fenomeno; in effetti, gli uccelli con infezione cronica da MS sembrano avere una popolazione microbica a livello tracheale maggiore dei soggetti con infezione da MG; ciò potrebbe determinare una maggiore eliminazione di particelle infettanti, oppure il MS potrebbe sopravvivere più a lungo di MG in forma essiccata. Essendo MS più difficile da controllare, per certi versi ci si è rassegnati a un minor livello di controllo.

Un'adeguata distanza (nell'ordine di chilometri) è la migliore protezione tra un allevamento infetto e gli allevamenti vicini. Negli anni '70 sono stati costruiti capannoni in conformità ad una distanza consigliata di 400 metri ai fini del controllo dei micoplasmi. Ciò si è dimostrato inadeguato per il controllo di MS. Sono comuni gli esempi di diffusione a distanze di oltre 2 km dovuti al vento. Ciò ha indotto i veterinari aziendali a ridimensionare l'importanza dell'infezione da MS (poiché non si era in grado di controllare efficientemente il MS e ovviamente non era possibile spostare i capannoni ad una distanza maggiore), mentre al contrario gli esperti stanno rivalutando il problema.

Vaccinazione per la micoplasmosi

La storia per il controllo della micoplasmosi comprende:

Antibiotici – se questi fossero stati in grado concretamente di creare gruppi di polli esenti da micoplasmi dopo il trattamento, allora il problema della micoplasmosi sarebbe stato risolto fin dal 1960;

Esposizione controllata prima che dell'inizio della deposizione [prima generazione di vaccini];

Ottenimento di gruppi di animali esenti da Micoplasmi tramite diversi metodi (calore o trattamento delle uova con antibiotici, schiusa e allevamento in piccoli gruppi);

Vaccini ad antigene inattivato;

Ceppi con un potere patogeno attenuato; [vaccini di seconda generazione] (per esempio ceppo F e 6/85). Tenere presente che il ceppo F è più patogeno del ceppo 6/85;

Ceppi a patogenicità attenuata; [vaccini di terza generazione] (ts-11 e MSH). Apatogeni e privi di effetti evidenti sulla produzione delle uova in assenza del challenge;

Vettori con inserzione dell'antigene micoplasma (GMOs);

Alcuni ricercatori hanno inoltre studiato le potenzialità d'uso degli iscoms (complesso immunostimolante), di vaccini a DNA e penso che proseguiranno in tali indagini.

I vaccini ad antigene inattivato inducono un'elevata risposta anticorpale umorale e ciò comporta la possibilità di poter monitorare la risposta vaccinale con test sierologici anticorpali (come avviene ad esempio per determinare la risposta del vaccino nei confronti della encefalomielite aviaria). I vaccini inattivati sono abbastanza efficaci nei confronti delle problematiche cliniche, ma sono costosi e non evitano l'infezione e non inducono una buona protezione delle vie respiratorie. I gruppi di polli vaccinati con i vaccini ad antigene inattivato, quando vengono a contatto con ceppi di campo, diventano portatori di micoplasmi patogeni e possono potenzialmente infettare altri gruppi di polli (anche se questi volatili presentano un elevato titolo di anticorpi specifici antimicoplasma).

Quando sono stati introdotti i vaccini ad antigene vivo si è pensato che questi potessero rappresentare un valido ausilio ed avere un ruolo fondamentale per eradicare i micoplasmi. Per tale motivo in Australia si è iniziato ad utilizzare il vaccino ts-11 per il MG. Siamo stati rapidamente in grado di controllare la comparsa di forme cliniche della malattia e la sua diffusione e di diminuire anche l'uso routinario degli antibiotici con un effetto complessivo positivo in tutti gli allevamenti dell'area sottoposta a vaccinazione. A questo punto i tecnici veterinari hanno suggerito ai managers della produzione che avrebbero anche potuto considerare di smettere di vaccinare. Questa era chiaramente una decisione di pertinenza veterinaria, ma nonostante i managers della produzione decisero di continuare a vaccinare perché non volevano più preoccuparsi di un'eventuale comparsa di gruppi positivi per MG e potevano così pianificare la produzione in modo più accurato (una minor confidenza nella pianificazione porta ad un incremento dell'utilizzo delle strutture ed a un maggior profitto). Pensandoci sopra, i managers della produzione hanno ragione in quelle situazioni in cui nulla è cambiato nel rischio che in un gruppo non vaccinato si manifesti l'infezione da MG. Per esempio, l'azienda di ovaiole è distante solo 400m, o l'azienda concorrente di broilers è giusto dietro l'allevamento, o una delle mille altre situazioni che sfuggono al controllo ed alle possibilità di intervento dell'industria.

I vaccini ad antigene vivo non sempre inducono sieroconversione e il rilievo degli anticorpi non è uno strumento molto utile al fine di monitorare l'efficacia della vaccinazione (e non può differenziare tra la risposta vaccinale e un challenge precoce). La PCR e le tecniche di identificazione dei ceppi si sono dimostrate molto più utili.

Conclusioni

La eradicazione del MG da un allevamento si può ottenere con l'uso del vaccino ts-11 (Turner e Kleven 1998) ma credo che l'uso di questi vaccini vivi di terza generazione debba essere limitato alle zone in cui il livello di rischio che un gruppo si infetti con micoplasma sia maggiore di quanto si è disposti ad accettare (ovvero, quanti gruppi di animali ogni anno siete disposti ad accettare che si infettino con micoplasmi?). In questa situazione una vaccinazione continua è una strategia da prendere seriamente in considerazione. La nostra tipologia di allevamento è impostata in modo molto pragmatico e questo rappresenta di solito il maggior limite nel garantire una situazione micoplasma-free. Un programma di eradicazione generale era stato proposto quando non era disponibile la terza generazione di vaccini ed era ancora possibile la collaborazione tra le aziende produttrici di riproduttori e l'industria delle ovaiole.

Protegete voi stessi!

Feberwee A, de Vries TS & Landman WJ. (2008). Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. *Avian Pathol.* 37:629-33.

Turner KS, & Kleven SH. (1998) eradication of live F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.* 42: 404-7

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

INDUCTION OF SEXUAL ACTIVITY IN MALE AND FEMALE FARMED OSTRICHES (*STRUTHIO CAMELUS*) WITH GNRH IMPLANT

Aiudi G., Nicassio M., Pagana G., Silvestre F., Giovanni M., Lacalandra G.M.

Dipartimento di Produzione Animale. Università degli Studi di Bari. Italy

Corresponding author: Prof. Giulio Aiudi. Dipartimento di Produzione Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari. S.p. Casamassima km 3, 70010 Valenzano (BA), Italy - Tel. +39 080 4679826 - Fax: +39 080 4679883 - Email: g.aiudi@veterinaria.uniba.it

Abstract

The annual photoperiodic changes are the most important factor controlling the reproductive activity in birds. A single subcutaneous implant of a slow-release GnRH analogue induced the seasonal reproductive activity in both sex of farmed ostriches. Significant increase in annual egg production and clutch number compared with control group were observed.

Key words - ostrich, GnRH, induction reproduction, eggs production

INDUZIONE DELL' ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA IN MASCHI E FEMMINE DI STRUZZI (*STRUTHIO CAMELUS*) D'ALLEVAMENTO MEDIANTE IMPIANTO DI GNRH

Riassunto

Le variazioni annuali del fotoperiodo rappresentano il più importante fattore di controllo dell'attività riproduttiva negli uccelli. Obiettivo della ricerca è stato quello di valutare la possibilità di anticipare l'attività riproduttiva in maschi e femmine di *Struthio camelus* mediante l'utilizzo di Buserelin. Un singolo impianto sottocutaneo a lento rilascio di GnRH analogo ha consentito di indurre l'attività riproduttiva ed ottenere un significativo incremento della produzione annuale di uova.

Parole chiave - struzzo, GnRH, induzione della riproduzione, produzione uova

Introduction

The ostriches (*Struthio camelus*) are large flightless birds native in Africa, raised commercially for their meat, eggs, hide and feathers. The first commercial ostrich farms were established in South Africa around 1860's, after that, ostrich farms began to spread gradually to other countries. In Italy ostrich breeding started at the beginning of 1990, rapidly evolving since then. However, ostrich farming still have some disadvantages; the unsatisfactory rate of productive parameters like fertility and hatching. Most of these problems are correlated with the photoperiodic regulation of seasonal breeding (Sharp, 1996).

Hypothalamic Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) is the key regulator of reproductive functions in all the vertebrate species. The activities of GnRH neurons are directly affecting GnRH synthesis and/or release, controlled by the biological photoperiodic clock (Yasuo *et al.*, 2003). The major function of this decapeptide is to modulate the synthesis and release of gonadotrophins (FSH, LH) from the pituitary (Schneider *et al.*, 2006).

In female birds, FSH promotes gonadal maturation and follicular selection as well as regulating progesterone secretion by granulosa cells of prehierarchal follicles, LH controls estrogen and androgen production by mature ovarian follicles, induces ovulation and regulates progesterone

ne secretion by granulosa cells (Leska and Dusza, 2007). In males, FSH stimulates gonadal growth and estrogen secretion by Sertoli cells and LH is responsible for androgen production by Leydig cells. Moreover, sex steroids maintain gonadal function, evoke secondary sex characteristics and impinge on sexual behavior (Kirby and Froman, 2000).

Ostrich is a long day breeding bird and the mating season lasts from six to eight months each year, although the timing and duration of breeding can vary with latitude and altitude. In the northern hemisphere, breeding starts during March and ends around August/September, while in the southern hemisphere it begins around July/August and finishes by the end of March. Male ostriches are polygamous and can mate with more than one female. Domesticated ostriches are kept in pairs (one male and one female) or trios (one male and two females) for the breeding season (Shanawany, 1994). Breeding season is heralded by courtship behaviour and hen starts to lay eggs shortly after mating. Eggs are laid every 1 or 2 day in clutches of 20-24 eggs. The hen stops laying for a period of 7 to 10 days, then she starts a new clutch. The average range is 35 to 55 eggs per hen, but there are high-producing females laying between 50 to 90 eggs in the breeding season.

One of the common purposes of ostrich breeders is increasing the number of eggs produced. The aim of the current research is to evaluate the use of a slow-release implant of GnRH analogue in order to anticipate the seasonal reproductive activity in male and female farmed ostriches and implementing the egg production.

Material and Methods

The study was carried out in an ostrich farm located in South-Italy (northern hemisphere) on 24 adult ostriches (eight males and sixteen females) African Black (4±1.4 years of age) from January to September 2008. The ostriches were divided into 2 groups: group A (treatment) and group B (control), each group composed of 4 trios. The trios were housed in separately pens (5000 m²) and exposed to natural photoperiod. Ostriches were fed with a self-prepared mash, supplemented with 1kg/bird/d of a pelleted commercial feed, and fresh water ad libitum.

In the first week of January, the males (103±9.2 kg bw) of group A received a single subcutaneous implant of 2.2 mg Buserelin acetate (Suprefact[®], Aventis Pharma, Italy), a Gonadotrophin-releasing hormone analogue, adsorbed in 13.2 ml biocompatible silicone (Bayer[®], Italy). After 7 days, the females (87±5.5 kg bw) of group A were received a single subcutaneous implant of 2 mg GnRH analogue, adsorbed in 10.8 ml biocompatible silicone. The ostriches of group B were treated in the same days of group A with a single subcutaneous implant contain only biocompatible silicone (13.2 ml/bird for males; 10.8 ml/bird for females). The implants were injected into the dorsal region with a 14Gx3/4" needle.

The trios were daily monitored for sexual behavior and for the eggs deposition in order to calculate laying rates and to compare it with past year's production. Obtained data were analyzed with ANOVA test and the difference considered significant for p<0.05.

Results and Discussion

In all treated ostriches of groups A and B the subcutaneous implant was completely reabsorbed after few days and no injection-site reaction or adverse drug reaction was observed.

Seven days (±2.8) after treatment, male ostriches of group A exhibited the courtship behavior (coltish, flap wings backwards and forwards, thudding sounds) with typical red colour on the skin of beak and shin. The females of group A showed the typical sexual behavior (crouching, hold wings horizontally, beak opening and closing) 5 days (±3.2) after treatment being mated during night hours. The hens started laying 12 days (±4.5) after treatment and they produced

FORT DODGE

FORT DODGE



Fort Dodge Animal Health S.p.A. | Via G. Amendola, 8 | I-40121 Bologna
info-it@fdah.com | www.fortdodge.it

1 egg every 2 days for 33 days (± 9.4), with a stop period of 10 days (± 2.8), then a new clutch started. Annual egg production, the number of annual clutches and eggs per clutch of group A during observed period (January-September) are reported in Table 1.

Significant differences in annual egg production (714vs489; $p < 0.05$) and mean clutch number (4.5vs3.1; $p < 0.05$) compared with past year's production were observed in group A. The hens of group B started laying 35 to 42 days after group A and annual egg production (497vs714; $p < 0.05$) and mean clutch number (3.4vs4.5; $p < 0.05$) during observed period were below compared with group A; no significant differences were observed in number of eggs for clutch.

Tab. 1 – Eggs production rates of group A during observed period

Trio	Hen	N° Clutches		Eggs/clutch ($ms \pm sd$)		Eggs/hen		Eggs/trio	
		2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
1 _A	H _{1.1}	4	5	21 \pm 1.4	20.4 \pm 1.8	84	102	165	199
	H _{1.2}	4	5	20.2 \pm 1.2	19.4 \pm 2.1	81	97		
2 _A	H _{2.1}	2	3	21 \pm 1.4	21.6 \pm 1.5	42	65	102	147
	H _{2.2}	3	4	20 \pm 2	20.5 \pm 1.9	60	82		
3 _A	H _{3.1}	3	5	18.6 \pm 1.6	18.8 \pm 2.2	56	94	132	190
	H _{3.2}	4	5	19 \pm 2.5	19.2 \pm 2.3	76	96		
4 _A	H _{4.1}	2	4	20 \pm 2.8	20 \pm 1.6	40	80	98	178
	H _{4.2}	3	5	19.3 \pm 3	19.6 \pm 2.6	58	98		
Total		25	36			497	714		

Conclusion

In African Black ostriches the annual reproduction is directly inhibited due to the short photoperiod and directly stimulated by the long photoperiod, effects being mediated by secretions of GnRH, FSH, LH. This new treatment with a single administration of a slow-release GnRH analogue is a valid method for anticipating the seasonal reproduction in male and female ostrich and can be used without collateral effects for increasing the annual egg production rates.

References

- Kirby, J.D., Froman, D.P., 2000. Reproduction in male birds. In: Sturkie's Avian Physiology, (eds) Whittow CG. Academic Press, London, pp 597-615.
- Leska, A., Dusza, S., 2007. Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in birds. *Reprod. Biol.* 7: 99-126.
- Schneider, F., Tomek, W., Gründker, C., 2006. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. *Theriogenology* 66: 691-709.
- Shanawany, M.M., 1994. The importance of light for ostriches. *Ostrich Update* 3: 52-54.
- Sharp, P.J., 1996. Strategies in avian breeding cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 42:505-513.
- Yasuo, S., Watanabe, M., Okabayashi, N., Ebihara, S., Yoshimura, T., 2003. Circadian clock genes and photoperiodism: comprehensive analysis of clock gene expression in the mediobasal hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus, and the pineal gland of the Japanese quail under various light schedules. *Endocrinol.* 144:3742-3748.

APPLICATION OF A PCR METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF ULCERATIVE ENTERITIS: PRELIMINARY RESULTS

Bano L.¹, Drigo I.¹, Bacchin C.¹, Marcon B.¹, Cocchi M.¹, Bonci M.¹, Vascellari M.², Agnoletti F.¹

¹ *Laboratorio di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy*

² *Laboratorio di Istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*

Corresponding author: Dr. Bano Luca. Laboratorio di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Viale Brigata Treviso 13/a, 31100 Treviso, Italy. Tel. +39 0422 302302, Fax: +39 0422 421154 - Email: lbano@izsvenezie.it

Abstract

Ulcerative enteritis or “quail disease” is an acute clostridial infection of young birds reported in many avian species, chicken and turkey included. *Clostridium colinum* is the causative agent of ulcerative enteritis and because of the difficulties bound to the isolation and identification of this bacterium by means of classic bacteriological techniques, its detection appears very hard and the prevalence of this disease could be underestimated. To investigate the diffusion of *C. colinum* in enteric disease of birds, a recently developed PCR protocol was applied to 42 cultural broths previously inoculated with organs and intestinal samples collected from diseased subjects. PCR-positive broths were cultivated to attempt the isolation of *C. colinum*. Samples collected from positive birds were subjected to histological examinations. 4 birds (3 broilers chickens and 1 pigeon) resulted PCR-positive and, in one case, *C. colinum* was isolated. Gross and histological lesions of positive birds were compatible with those described in other ulcerative enteritis outbreaks. These preliminary results demonstrates that *C. colinum* is sporadically implicated in enteric diseases of broiler chickens (14.2%). In addition, the PCR assay proved to be an useful and reliable instrument to support the diagnosis of ulcerative enteritis and to facilitate the isolation of *C. colinum*.

Key words: diagnosis, ulcerative enteritis, *Clostridium colinum*, PCR

IMPIEGO DELLA PCR NELLA DIAGNOSI DELL'ENTERITE ULCERATIVA: RISULTATI PRELIMINARI

Riassunto

L'enterite ulcerativa o “quail disease” è il risultato di un'infezione acuta da *Clostridium colinum* che colpisce prevalentemente soggetti giovani e che è stata descritta in molte specie aviari, pollo e tacchino compresi. La diagnosi di tale patologia attraverso tecniche di microbiologia tradizionali risulta particolarmente indagine a causa dei lunghi tempi richiesti dall'esame batteriologico e dalla mancanza di terreni colturali selettivi. Con il presente studio si è voluta indagare l'utilità dell'applicazione di un protocollo in PCR nella diagnosi dell'enterite ulcerativa. A tale scopo una PCR specifica per *C. colinum* è stata applicata a 42 brodi colturali d'arricchimento precedentemente inoculati con materiale patologico prelevato da soggetti affetti da sindrome enterica. Successivamente gli organi e i campioni intestinali dei soggetti risultati positivi alla PCR, sono stati sottoposti ad accertamenti istopatologici. 3 broiler e 1 piccione sono

risultati positivi alla PCR e in uno di questi casi è stato isolato *C. colinum*. Le lesioni anatomopatologiche e istologiche dei soggetti positivi erano compatibili con quelle descritte in altri episodi di enterite ulcerativa. Questi risultati dimostrano che la PCR è uno strumento utile ed affidabile per la diagnosi di enterite ulcerativa e può essere utilizzata come supporto all'isolamento di *C. colinum*. Inoltre, dai risultati preliminari, *C. colinum* appare sporadicamente (14,2 %) implicato nelle patologie enteriche che colpiscono i broiler in Italia.

Parole chiave: diagnosi, enterite ulcerativa, *Clostridium colinum*, PCR

Introduction

Ulcerative enteritis (UE) or “quail disease” is a severe bacterial disease induced by *Clostridium colinum* that affects various species of birds, including chickens and turkeys. An ulcerative-like disease associated with *C. perfringens* type A, has been recently reported in quails (*Colinus virginianus*) (Berkhoff, 1975; Shivaprasad *et al.*, 2008).

C. colinum is a spore forming obligate anaerobe which grows in 42 hours in enriched media. The lack of selective cultural media for *C. colinum* and the time consuming procedures required for its isolation, makes difficult the diagnosis of ulcerative enteritis by classic bacteriological techniques. To simplify the identification of *C. colinum* cultures and its detection in broths inoculated with organs and faeces, a species specific PCR protocol has been recently developed (Bano *et al.*, 2008). The present study reports the preliminary results arisen from the application of the cited PCR assay to cultural broths previously inoculated with organs and intestinal samples collected from birds with enteritis.

Materials and methods

Samples collection. 42 birds submitted in 2008 for post-mortem examination to the veterinary diagnostic laboratory of Treviso (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie), were included in the study on the base of enteric symptomatology or the presence of intestinal lesions. Portions of organs (liver and spleen) and intestine were collected from 7 quails (*Coturnix coturnix*), 21 chickens, 3 turkeys, 3 guinea fowls (*Numida meleagris*), 3 pigeons (*Columba livia*), 1 pheasant (*Phasianus colchicus*), 1 swan, 1 parrot, 2 partridges (*Perdix perdix*).

Bacteriological examination. One gram of each sample was inoculated in an enrichment broth designed for spore forming anaerobes (Cooked Meat Medium, Difco) and the tubes were incubated at 37 °C in anaerobic chamber. After 42 hours of incubation, 1 ml of broth was processed by a species specific PCR for *C. colinum* and 10 µl of enriched broths were plated on Columbia Agar and in Perfringens Agar Base (Oxoid) containing 5% of sheep red blood cells. The plates were incubated for 42 hours at 37 °C. Strictly anaerobic colonies were subcultured on Columbia Agar containing 5% of sheep red blood cells and Colonies of Gram positive rods were processed by PCR for the identification of *C. colinum*.

***Clostridium colinum* PCR.** 1 ml of enriched broths was centrifuged at 12.000 rcf for 3 minutes and DNA was extracted from the pellet by means of a commercially available kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen), according to manufacturer's instructions. The same kit was employed to extract DNA from pure bacterial cultures of anaerobe obligate Gram-positive rod shaped bacteria isolated from enriched broths tested positive at the PCR for *C. colinum*. To detect *C. colinum* a recently developed

species-specific PCR protocol was applied (Bano *et al.*, 2008). Major toxins (α , β 1, ϵ , ι), enterotoxin, β 2 toxin and NetB toxin encoding genes of *C. perfringens* isolates were searched by previously described PCR protocols (Drigo *et al.*, 2008; Keyburn *et al.*, 2008)

Histological examination. During the necropsy of chickens, portions of the same samples submitted for bacteriological examinations, were fixed in 10% neutral buffered formalin for 5 days. All tissues were then embedded in paraffin, sectioned at 4 μ m, stained with haematoxylin and eosin and observed by light microscopy. Gram stain was also performed.

Parasitological and virological examination. Intestinal mucosa of all chickens was scraped in different districts and observed by optic microscope searching for protozoa and helminths. If hemorrhagic or necrotic intestinal lesions were present, parasitological examination was performed also directly on these lesions. The intestines were examined for viruses by negative stain electron microscopy by standard methods.

Results and discussion

The enteric lesions observed were classified as ulcerative enteritis (11/42), catarrhal or catarrhal-hemorrhagic enteritis (13/42) or necrotic enteritis (18/42). 3 chickens (14.2%) and 1 pigeon resulted positive at the PCR assay and *C. colinum* was isolated from the enriched broth inoculated with intestinal samples collected from the pigeon. Two of the three positive broiler chickens were 60 days old and came from the same farm. The third positive chicken was 40 days old. All PCR-positive chickens showed ulcerative enteritis and were negative for parasites and viruses but *C. perfringens* type A, *netB* negative was isolated. White foci of necrosis were disseminated in the hepatic parenchyma. At post-mortem examination the *C. colinum* positive pigeon showed hepatic focal necrosis and a severe hemorrhagic enteritis with abundant uncoagulable blood in the intestinal lumen. Whitish ulcers were visible through the serosa of the intestinal final tract and the lumen of the duodenum was enlarged by the presence of numerous helminths (ascarids). The histological examination of the three chickens revealed intestinal necrosis associated with lymphocyte infiltrations and the presence of Gram positive rod shaped bacterial aggregates. A lymphoid hyperplasia with a “starry sky” aspect and general congestion was observed in the spleen. In the liver, multifocal necroses of the hepatocytes associated with Gram positive rod shaped bacterial aggregates were detected. Bacterial aggregates were present also in the lumen of hepatic vessels and sinusoids.

These preliminary results demonstrate that *C. colinum* is sporadically involved in enteric diseases of broiler chickens in Italy even if sample size should be increased to establish more accurately the authentic diffusion of this micro-organism in diseased population. The PCR detected *C. colinum* DNA in 4 of 11 birds with lesions ascribable to ulcerative enteritis. The negativity of the other 7 subjects could be due to the implication of different intestinal pathogens or to the sensitivity of the PCR assay. The PCR results were sustained also by the histological detection of bacterial aggregates with morphological and Gram-stained characteristics referable to *C. colinum* in parenchymatous organs. *C. perfringens* strains were isolated only from the intestines and all strains belonged to toxin-type A (α -toxin coding gene positive) which is considered an usual finding also in healthy birds. The isolation of *C. colinum* resulted very hard because colonies were visible in 48 hours while the overgrowth of contaminants was

early. For this reason the develop of selective media should be take in consideration to support future investigations on *C. colinum*.

Conclusions

In conclusion *C. colinum* is sporadically implicated in enteric diseases of broiler chickens in Italy and the PCR assay proved to be an useful and reliable instrument to support the diagnosis of ulcerative enteritis and to facilitate the isolation of *C. colinum*.

References

- Bano, L., Drigo, I., Macklin, K. S., Martin, S. W., Miller, R. S., Norton, R. A., Oyarzabal, O. A., Bilgili, S. F., 2008. Development of a polymerase chain reaction assay for specific identification of *Clostridium colinum*. *Avian Pathol.* 37(2), 179-181.
- Berkhoff, G.A., 1975. Ulcerative enteritis - clostridial antigens. *Am. J. Vet. Res.* 36, 583-585.
- Drigo, I, Agnoletti, F., Bacchin, C., Bettini, F., Cocchi, M., Ferro, T., Marcon, B., Bano, L., 2008. Toxin-genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. *Ital J. Anim. Sci.* 7: 397-400.
- Keyburn, L., Boyce, J.D, Vaz, P., Bannam., T. L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J. I, Moore, R. J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: 0001-0011.
- Shivaprasad, H. L., Uzal, F., Kokka, R., Fisher, D. J., McClane, B. A., Songer, A. G., 2008. Ulcerative enteritis-like disease associated with *Clostridium perfringens* type A in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Dis.* 52:635-640.

OUTBREAK OF PSEUDOTUBERCULOSIS IN COMMERCIAL GUINEA FOWLS (*NUMIDA MELEAGRIS*)

Bonci M., Drigo I., Agnoletti F., Cocchi M., Guolo A., Bano L.

Laboratorio di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy

Corresponding author: Dr. Luca Bano. Laboratorio di Treviso, Istituto Zooprofilattico delle Venezie. V.le Brigata Treviso 13/A, 31100 Treviso (TV), Italy – Tel. +39 0422 302302 Fax: +39 0422 421154. Email: lbano@izsvenezie.it

Abstract

The present paper reports an outbreak of pseudotuberculosis in guinea fowls reared for meat production. The clinical and pathological features as well as the results of the laboratory investigations are described. To the knowledge of the authors this is the first reported case of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in guinea-fowls.

Key words: guinea fowl, septicaemia, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Riassunto

Focolaio di pseudotubercolosi in faraone (*Numida meleagris*) d'allevamento

Il presente lavoro descrive un episodio di mortalità riconducibile ad una sindrome setticemica osservata in un gruppo di faraone da carne prossime alla macellazione. L'esame batteriologico ha permesso di isolare *Yersinia pseudotuberculosis* dai fegati e dalle milze di tutti i soggetti sottoposti ad autopsia. Tale microorganismo, che è stato isolato da ruminanti domestici e selvatici, suini, mammiferi ospiti di giardini zoologici e lagomorfi, sembra trovare nei roditori e negli uccelli selvatici il suo serbatoio naturale. In letteratura vi sono segnalazioni in volatili ornamentali di casi di pseudotubercolosi sia sporadici che epidemici e, tra le specie domestiche allevate intensivamente, sono segnalati focolai epidemici nel tacchino. Tuttavia non risulta alcuna segnalazione della malattia nella faraona. In considerazione del ruolo di serbatoio svolto da roditori e uccelli selvatici, i volatili d'allevamento, in particolar modo quelli che usufruiscono di parchetti esterni, sono potenzialmente esposti al rischio di infezione da *Y. pseudotuberculosis*. Pertanto in presenza di forme setticemiche, soprattutto caratterizzate da epatite necrotica, sarebbe opportuno porre in diagnosi differenziale anche la pseudotubercolosi.

Parole chiave: faraona, setticemia, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Introduction

Yersinia pseudotuberculosis is a Gram negative, rod shaped, oxidase negative bacterium, member of the Enterobacteriaceae family. It has been isolated from wild and domestic ruminants, swines, mammals living in zoological gardens and hares even if rodents and wild birds are thought to be the main reservoir of this microorganism (Mair, 1973; Toma, 1986). *Y. pseudotuberculosis* can cause an acute septicaemia, with sudden death, as well as a less acute disease characterized by weakness, persistent diarrhoea, lameness, progressive emaciation and by the appearance of caseous tubercle-like lesions in parenchymatous organs. It can infect humans through ingestion of contaminated food and water and causes mesenteric lymphadenitis and acute terminal ileitis (Harcourt-Brown, 1978).

Surveys have been carried out in order to assess the prevalence of *Y. pseudotuberculosis* in wild birds and mammals through bacteriological examination of faecal or cloacal samples; they

revealed prevalences lower than 1% in birds and of 5.6% in a variety of mammals such as deers, hares, martens and racoon dogs (Levrè *et al.*, 1989; Fukoshima and Gumyoda, 1991; Niskanen *et al.*, 2003).

Sporadic and epidemic cases of pseudotuberculosis have been reported in ornamental birds; epatomegaly and splenomegaly, small grey-white nodules in the liver and spleen, and congestion of the lungs, were the most commonly observed lesions (Harcourt-Brown, 1978). Reports of the disease in domestic birds are rare and mainly concern turkey flocks. In the outbreaks described by Wallner-Pendleton and Cooper (1982) two kind of gross lesions were observed: enlarged livers and spleens with miliary grayish-white necrotic foci and catarrhal enteritis or enlargement and greenish discoloration of the livers and osteomyelitis (Wallner-Pendleton and Cooper, 1982). *Y. pseudotuberculosis* was isolated from the liver, the spleen and the bone marrow. Control of the disease was achieved by in-feed administration of tetracycline, but high condemnation rate was recorded at slaughter because of septicaemic lesions. Ground squirrels affected by pseudotuberculosis were identified as source of the infection in one of the outbreaks (Wallner-Pendleton and Cooper, 1982).

The present paper reports the results of the laboratory investigations carried out in a commercial guinea fowl flock affected by pseudotuberculosis. To our knowledge this is the first report of pseudotuberculosis in guinea fowls.

Material and methods

The carcasses of seven guinea fowls from a commercial farm were submitted to our laboratory on two different occasions, with a seven-day interval, for post-mortem investigations. In addition two birds were submitted alive, housed in our facilities and observed for two months in order to evaluate the progression of the illness. At death they were examined for gross lesions. At necropsy liver and spleen samples were collected to perform bacteriological examination. The samples were plated on blood agar and Eosin-Methylene blue agar. The plates were then incubated at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 24-48h under aerobic conditions. The identification of isolated strains was achieved by miniaturized biochemical test (API 20 E BioMerieux). Antimicrobial susceptibility testing was performed according to Kirby Bauer method using a standard panel of antibiotics for Gram negative bacteria. Isolation of *Salmonella* sp. was attempted from the gut according to standard methods for the detection of both motile and non motile Salmonellae. The intestinal contents were examined for parasites and processed by negative contrast electron microscopy for virus detection. Samples of livers were fixed in 10% buffered formalin for histology and histochemistry (Ziehl-Neelsen staining).

Results and discussion

In March 2008 a flock of 1,000 guinea fowls located in northern Italy experienced a sudden onset of a 0.8% daily mortality associated with depression. The guinea fowls, which were one hundred days hold, were housed in sheds provided with barriers against the entry of wild birds and in communication with an outdoor aviary. Pest control measures were regularly adopted and feed distribution took place inside the sheds. The flock was vaccinated for Newcastle disease and received a treatment for intestinal parasites.

At necropsy disseminated miliary necrosis of the liver and enlargement and marbling of the spleen were observed in five birds; three birds showed greenish diarrhoea.

Parasitological examination revealed the presence of intestinal Nematodes (*Ascaridia galli*) in three birds and flagellated protozoa in one bird.

Electron microscopy did not reveal the presence of any viruses.

Bacteriological examination of livers and spleens collected from five animals yielded a pure culture of non-haemolytic, Gram negative and oxidase negative bacteria identified as *Yersinia pseudotuberculosis*. The *Y. pseudotuberculosis* isolates showed resistances to colistin and spiramycin and sensitivities to the other tested molecules, including tetracycline, flumequine and apramycin.

Attempted isolation of *Salmonella* sp. gave negative result.

Histological examination of the liver and showed multifocal piogranulomatose lesions with purulent necrotic centre and infiltration of multinucleate giant cells: features ascribable to pseudotuberculosis.

The search of acid-alcohol resistant bacteria gave negative results.

One of the two birds kept under observation survived 2 weeks until spontaneous death. The second one was humanly sacrificed 6 weeks later. During the observation period they showed progressive wasting in spite of normal appetite. At necropsy cachexy, perihepatic cronic pedunculate lesions and hepatic hypoplasia were observed in both subjects.

On the basis of the results of the antimicrobial susceptibility test the birds received an in-feed tetracycline treatment.

The antibiotic therapy controlled effectively the disease and at the end of the withdrawal time the flock was slaughtered. Unfortunately we have no data concerning the condemnation rate at the abattoir, however a condemnation rate above the norm was reported in turkeys (Wallner-Pendleton and Cooper, 1982).

Conclusions

The pathological features observed in the carcasses of the guinea fowls submitted to our laboratory were consistent with a bacterial septicaemia and did not differ from those reported in other avian species affected by pseudotuberculosis (Harcourt-Brown, 1978; Wallner-Pendleton and Cooper, 1982). The bacteriological examination of livers and spleens yielded pure cultures of *Y. pseudotuberculosis*. The kind of farm with an outdoor aviary lead us to hypothesize that a contact with infected wild animals such as birds or mammal carriers, could have been the origin of the infection. The reported case suggests to consider Pseudotuberculosis among the diseases responsible for necrotic hepatitis in outdoor-reared guinea fowls.

References

- Fukushima, H., Gomyoda, M., 1991. Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 4: 1152-1155.
- Harcourt-Brown, N.H., 1978. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in birds. *Vet. Rec.* 102: 315.
- Levrè, E., Valentini, P., Brunetti, M., Sacchelli, F., 1989. Avifauna stanziale e migratoria come riserva di *Salmonella*, *Yersinia* e *Campylobacter*. *An. Ig.* 729-740.
- Mair, N. S., 1973. Yersiniosis in wildlife and its public health implications. *J. Wild. Dis.* 9: 64-71.
- Niskanen, T., Waldenström, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Olsen, B., Korkeala, H., 2003. virF-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 8: 4670-4675.
- Toma, S., 1986. Human and nonhuman infections caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in Canada from 1962 to 1985. *J. Clin. Microbiol.* 24: 465-466.
- Wallner-Pendleton, E., Cooper, G., 1982. Several outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* in California turkey flocks. *Avian Dis.* 27, 2: 524-526.

VIRULENCE-ASSOCIATED GENES IN AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* OF TURKEY

Circella E.¹, Pennelli D.², Tagliabue S.², Ceruti R.³, Giovanardi D.⁴, Camarda A.¹

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bari

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Brescia

³ Gruppo Amadori, Cesena

⁴ Laboratorio Tre Valli, San Martino Buon Albergo (VR)

Abstract

50 *Escherichia coli* (APEC-Avian Pathogenic *Escherichia coli*) strains and 15 *E. coli* (AFEC-Avian Faecal *Escherichia coli*) from turkeys affected by colibacillosis and from healthy turkeys were tested for the presence of eight different virulence-associated genes. Besides, APEC were serotyped. O78 has been the most detected serotyped. The presence of the tested virulence genes was prevalently related to the APEC isolates. With reference to serogroup, all the tested O78 resulted *iss* and *irp2* positive. Besides, *tsh* e *cva/cvi* were respectively present in 88.9 and 83.3 % of O78. Nevertheless, the finding of a not typeable strains equipped with all the eight tested virulence genes among the APEC isolates suggest the importance of a careful and complete characterisation of the isolate to evaluate the real potential pathogenic attitude of the bacterium.

Key words: *Escherichia coli*, turkeys, serotyping, virulence genes

GENI DI VIRULENZA IN AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* NEL TACCHINO

Riassunto

In questa ricerca, 50 stipiti di *E. coli* isolati da tacchini affetti da colibacillosi (APEC) e 15 *E. coli* provenienti dal contenuto intestinale di soggetti sani (AFEC) sono stati caratterizzati e sottoposti alla ricerca di 8 differenti geni di virulenza. Gli stipiti APEC sono inoltre stati sierotipizzati al fine di evidenziare i sierotipi più frequentemente associati alla malattia. Tra questi, O78 è risultato il sierotipo di gran lunga prevalente. I geni di patogenicità ricercati sono risultati fortemente associati agli stipiti patogeni rispetto a *E. coli* di origine fecale. Considerando il sierotipo di appartenenza, la totalità di O78 testati presentava i geni legati ai sistemi di acquisizione del ferro ed una elevata percentuale risultava *tsh* e *cva/cvi* positiva, confermando il potenziale ruolo di tali geni nella patogenicità di tali sierotipi. Il riscontro tuttavia di uno stipite non tipizzabile sierologicamente e munito di tutti gli 8 geni di virulenza ricercati pone l'attenzione sull'importanza di effettuare una completa e accurata caratterizzazione dell'isolato per poterne valutare l'effettivo potenziale patogeno.

Parole chiave: *Escherichia coli*, tacchini, sierotipizzazione, geni di virulenza

Introduction

Colibacillosis infections are cause of important economic losses in turkey industry. These infections are often characterised by respiratory lesions, in particular airsaccu-litis associated with pericarditis, perihepatitis and peritonitis. Environmental factors or viral infections may influence the outcome of colibacillosis. Nevertheless, avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) may play a role as single aetiological agent. Moreover, *E. coli* superinfection may increase the pathogenic attitude of mycoplasma or *Chlamydophila psittaci* in turkey (Van Loock *et al.* 2006).

The presence of virulence-associated genes seems to be linked to the pathogenic attitude of the bacteria. Nevertheless, this association is still uncertain and their exact role is yet unclear.

In this study, the presence of eight different virulence-associated genes has been investigated in *E. coli* from turkeys affected by colibacillosis. To this aim, 50 *E. coli* (APEC-Avian Pathogenic *Escherichia coli*) were collected, serotyped and tested for the presence of the putative virulence genes. Besides, 15 *E. coli* (AFEC-Avian Faecal *Escherichia coli*) were collected from the gut of healthy turkeys to compare and better interpret the obtained results.

Materials and methods

50 *Escherichia coli* (APEC-Avian Pathogenic *Escherichia coli*) strains and 15 *E. coli* (AFEC-Avian Faecal *Escherichia coli*) were respectively collected from turkeys affected by colibacillosis and from healthy turkeys coming from different intensive farms of Italy. Each strain was cultured on MacConkey agar (OXOID) and incubated at 37 °C for 24h. Every compatible colony was isolated on Trypticase Soy Agar (TSA) (OXOID) and incubated at 37 °C for 24h. The biochemical identification was carried out using the API-20E method (Bio-MERIEUX). All *E. coli* strains were stored at -20 °C in Brucella broth (OXOID) with glycerine (20%) before the execution of the characterisation test.

Serotyping. The APEC isolates were serotyped. Serotyping was carried out using monospecific antisera towards 40 different somatic O antigens (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O68, O73, O75, O78, O83, O85, O86, O88, O92, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157) in U bottom polystyrene microtitre plates incubated for 24 hours at 37 °C in a moist box (Blanco and Blanco, 1993).

Genotyping. The genetic characterisation was performed on APEC and AFEC isolates using a Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) according to Ewers *et al.* (2005). *E. coli* were tested for the presence of enteroaggregative toxin (*astA*), increased serum survival protein (*iss*), iron-repressible protein (*irp2*), aerobactin (*iucD*), P-fimbriae (*papC*), temperature-sensitive hemagglutinin (*tsh*), vacuolating autotransporter toxin (*vat*), colicin V plasmid operon genes (*cva/cvi*).

Results and discussion

A relevant number among the APEC isolates were typeable using somatic O antisera. 14 different serogroups were identified (table 1). In order of frequency, the most de-

tected serogroups associated to the disease have been O78 (36%), O8, O73 (6%), O2, O9, O20, O139, O141 (4%).

The detection of the virulence-associated genes was most related to the *APEC* isolates, in particular for *iss*, *iucD*, *cva/cvi* (table 2). Moreover, *irp2*, *tsh* and *vat* have been exclusively found in the septicaemic strains.

The greater association observed of the putative virulence genes to the septicaemic isolates may increase the potential pathogenic attitude of the bacteria by different mechanisms. For example, *irp2* and *iucD* encode for two different systems of iron acquisition as yersiniabactin and aerobactin, respectively, and may increase the survival of the bacterium in the host in conditions of poor density of iron. *tsh*, which encodes for a temperature sensitive hemagglutinin, seems to be important in the early stages of the colonisation of the respiratory tract and for the invasion of the bloodstream (Ewers *et al.* 2003). *vat* encodes for a vacuolating autotransporter toxin while *papC* for the P-fimbriae which allows *E. coli* to adhere to the tissue and protect the bacterium from the inflammation cells activity. *cva/cvi* is indicative of the presence of *col V*-plasmid which may serve as vector of several putative virulence genes as *tsh*, *iss*, genes encoding for iron acquisition systems (Johnson *et al.* 2006) or antimicrobial resistance factors. *astA*, encoding for an enteroaggregative stable toxin, is considered a virulence factor associated with diarrhoea in human and animals but was also expressed by several non-pathogenic *E. coli* in humans and animals. In our study, *astA1* was most detected among the strains from gut of healthy turkeys in respect to the *APEC* isolates (table 2). In this research, the distribution of the virulence-associated genes in *E. coli* O78, the serogroup more frequently detected among the *APEC* isolates, has been of relevance. *iss* and *irp2* have been found in all O78 and *tsh* and *cva/cvi* were detected in the most of O78 (table 3). These genes, and in particular *tsh* and *cva/cvi*, were identified less frequently in *E. coli* of other serogroups or not-typeable strains. These findings confirm the importance of the presence of these genes to increase the pathogenic attitude of the bacterium. In fact, O78 notoriously represent the most associated serogroup to the disease in poultry (Barnes *et al.* 2003).

vat was never found in O78 (table 3). In previous observations, this gene was absent or sporadically detected in O78 while frequently associated with O2 (Vandekerchove *et al.* 2005). Likewise, the O2 strains detected in this study were *vat*-positive. At present, we are not able to explain the reason of this apparent correlation between *vat* and O2 serogroup. Finally, we point out the finding of a not-typeable strain among the *APEC* isolates equipped with all the eight tested virulence genes.

Conclusion

In this study, a relevant correlation between the virulence-associated genes investigated and the *E. coli* strains from affected turkeys was observed. The virulence genes more frequently detected among the *APEC* strains have been *iss*, *iucD*, *cva/cvi*. *Iss* and *iucD* were present in all tested O78, while *tsh* and *cva/cvi* were of high relevance in O78 in respect to other serogroups. These observations are, in our opinion, of relevance and prove the importance of these virulence-associated genes, considering that O78 has been the most detected serogroup among the *APEC* isolates and is notoriously related to the disease. The finding of a not-typeable *APEC* strain equipped with all the eight tested genes confirms the importance of characterisation in depth to define the potential pathogenic attitude of the isolate.

ELANCO

Professionisti della Qualità



...da Sempre

Elanco Animal Health

Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A. - Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)

Tel. 055 4257.031 - Fax 055 4257.068 www.elanco.com

References

- Barnes H.J., Vaillancourt J., Gross W.B. Colibacillosis. 2003. In Disease of Poultry. 11th Edition. Editor in Chief Saif Y. M. Associated Editors Barnes H. J., Glisson J. R., Fadly A. M., McDougald L. R., Swayne D. E. 18: 631-656.
- Blanco, J., Blanco, M. (1993). Escherichia coli enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origin humano y bovino. Servicio de publicaciones Diputacion Provincial San Marcos, s/n. 27001 Lugo.
- Ewers C., Janben T., Kiebling S., Philipp H.C., Wieler L.H., 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in Avian Pathogenic Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction. Avian Dis. 49: 269-273
- Ewers C., Janssen T., Wieler LH. 2003. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). Berl Munch Tierarztl Wochenschr. Sep-Oct; 116(9-10): 381-95
- Johnson T.J., Siek K.E., Johnson S.J., Nolan L.K. 2006 DNA Sequence of a ColV Plasmid and prevalence of selected Plasmid-encoded virulence genes among avian Escherichia coli strains. Journal of bacteriology, vol. 188, n. 2, 745-758.
- Van Loock M., Loots K., Van Heerden M., Vanrompay D., Goddeeris BM. 2006. Exacerbation of Chlamydophila psittaci in turkeys superinfected by Escherichia coli. Vet. Res. Nov-Dec; 37 (6): 745-55
- Vandekerchove D., Vandemaele F., Adriaensen C., Zaleska M., Hernalsteen J.P., De Beats L., Butaye P., Van Immerseel F., Wattiau P., Laevens H., Mast J., Goddeeris B., Pasmans F., 2005. Virulence-associated traits in avian Escherichia coli: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. Vet Microbiol 108: 75-87

Table 1. Serogroups distribution among *E.coli* from colibacillosis affected turkeys

Not typeable	10	(20)
Typeable	40^a	(80)^b
O1	1	(2)
O2	2	(4)
O4	1	(2)
O8	3	(6)
O9	2	(4)
O11	1	(2)
O15	1	(2)
O20	2	(4)
O21	1	(2)
O73	3	(6)
O78	18	(36)
O86	1	(2)
O139	2	(4)
O141	2	(4)

Note: ^a Number of isolates, ^b % of detection

Table 2. Virulence-associated genes in *E. coli* from colibacillosis affected and healthy turkeys

	<i>astA1</i>	<i>iss</i>	<i>irp2</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>Vat</i>	<i>cva/cvi</i>
<i>APEC</i> (n° 50)	11 ^a (22) ^b	42 (84)	27 (54)	39 (78)	8 (16)	22 (44)	8 (16)	29 (58)
<i>AFEC</i> (n° 15)	4 (26.7)	4 (26.7)	0 (0)	5 (33.3)	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.7)

Note: ^a Number of isolates, ^b % of detection

Table 3. Virulence-associated genes in *E. coli* serogroups from turkeys affected by colibacillosis

	<i>astA1</i>	<i>iss</i>	<i>irp2</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>Vat</i>	<i>Cva/cvi</i>
	2 ^a		11		2	16		
O78 (n° 18)	(11.1) ^b	18 (100)	(61.1)	18 (100)	(11.1)	(88.9)	0 (0)	15 (83.3)
Other serogroups (n° 22)	6 (27.3)	17 (77.3)	13 (59.1)	14 (63.6)	3 (13.6)	4 (18.2)	6 (27.3)	11 (50)
Not typeable (n° 10)	3 (30)	7 (70)	3 (30)	7 (70)	3 (30)	2 (20)	2 (20)	3 (30)

Note: ^a Number of isolates, ^b % of detection

MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF POULTRY MEATS-RESULTS OF INSPECTIONS CARRIED OUT IN THE PROVINCE OF MILAN

Colmegna S.*, Invernizzi A.*, Mascher A.*, Corsale E.**, Ferrazzi V.**, Grilli G.**

*: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Milano, Via Celoria 10, 20133.

** Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi, Via Celoria 7, 20133, Milano

Corresponding author: Dott. Grilli Guido, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi, Via Celoria 7, 20133, Milano – tel +30 02-50318121, fax +30-02 50318106, Email: guido.grilli@unimi

Riassunto: Sono stati esaminati, sotto il profilo microbiologico quali/quantitativo (C.B.T., Coliformi, *E. coli*, *S. aureus*, Clostridi solfito-riduttori, *B. cereus*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. e *Campylobacter* spp.), 240 campioni di carni avicole (pollo, tacchino e quaglia) conferite ufficialmente in base alle norme previste dal Piano regionale di programmazione e coordinamento degli interventi in materia di controllo ufficiale dei prodotti di origine animale della Lombardia e da alcune aziende private per autocontrollo. La CBT è risultata sempre bassa ed in linea con quanto riportato in bibliografia così come è avvenuto anche per i coliformi, *E. coli*, *S. aureus*, Clostridi solfito riduttori e *B. cereus*. Per quanto riguarda *Salmonella* spp., solo 5 campioni sono risultati positivi: uno a *S. typhimurium* e uno a *S. enteritidis* (pollo), un solo campione di tacchino è risultato positivo a *S. blokley* e due di quaglia su cinque campioni analizzati sono risultati positivi a *S. typhimurium*. Circa il 3% dei campioni analizzati è risultato positivo a *Listeria monocitogenes* ma entro i limiti di legge. La ricerca dei *Campylobacter* termofili ha interessato solo 50 campioni e solo 5 sono risultati positivi. Questi risultati confermano l'elevata qualità igienico-sanitaria delle carni avicole, in accordo a quanto riportato nella bibliografia nazionale e nel rispetto delle norme comunitarie.

Key words: pollo, tacchino, carne, cariche microbiche

Summary: Under the qualitative/quantitative microbiological profile (C.B.T., Coliforms, *E. coli*, *S. aureus*, Sulphate-reducing Clostrides, *B. cereus*, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. and *Campylobacter* spp.), 240 samples of poultry meat (chicken, turkey and quail) were examined and officially considered according to the norms envisioned by the regional plan of the programming and co-ordinating of operations concerning official inspections of Lombardy animal origin and from a few private industries for self-inspection. The CBT always turned out to be less and in line with that reported in the bibliography, as is also the case with coliforms, *E. coli*, *S. aureus*, sulphate reducing Clostrides and *B. cereus*. As for *Salmonella* spp., only 5 samples have turned out positive: one for *S. typhimurium* and one for *S. enteritidis* (chicken); only one sample from turkey has turned out positive for *S. blokley*, and two out of five samples analysed from quail have been positive for *S. typhimurium*. About 3% of the samples



LOHMANN ANIMAL HEALTH: il profilo di un'azienda

Il gruppo

La società Lohmann Animal Health (LAH) fa parte del gruppo Paul-Heinz Wesjohann (PHW), che opera nel settore zootecnico occupandosi in modo particolare della **prevenzione, terapia e alimentazione** degli animali.

Le altre aziende facenti parte del PHW operano a livello internazionale principalmente nei seguenti ambiti:

- Specialità alimentari e Filiera Avicola (Wiesenhof)
- Nutrizione e salute animale, di cui fa parte l'azienda Lohmann Animal Health
- Benessere e alimentazione umana

Attività

- **Vaccini Avicoli**
Una gamma di vaccini innovativi per avicoli, come il primo vaccino orale al mondo contro l'anemia infettiva e vaccini vivi contro la salmonella.
- **Additivi per la nutrizione animale**
La LAH dispone di una vasta gamma di principi attivi rivolti verso l'industria mangimistica
- **Prodotti Farmaceutici**
Una varietà di prodotti veterinari per somministrazione e orale per numerose aziende leader europee.

LAH – una squadra di specialisti per la salute e la nutrizione animale, con l'obiettivo di mantenere gli animali in buona condizione.



LOHMANN ANIMAL HEALTH GmbH & Co. KG
Heinz-Lohmann-Str. 4 · 27472 Cuxhaven · Germania

analyzed have turned out positive for *Listeria monocitogenes*, but within the limits of the law. Research on *Campylobacter thermophiles* has involved only 50 samples, of which only 5 have resulted positive. These results confirm the high quality of hygiene and cleanliness of poultry meat, in agreement with that reported in the national bibliography and with respect to EU norms.

Key words: poultry, meat, microbiology quality

Introduction

The recent crises which have hit the meat food department (dioxins, avian flu, BSE, etc.), have provoked notable repercussions on consumption and have highlighted the fact that public opinion is today more attentive and sensitive than in the past, relative to the problems connected to the hygiene/sanitation aspects of the origins of animal food and of the technologies of animal farming (Pignatelli 2002). This evolution has induced the European Commission to consider as a strategic priority the achievement of the highest possible standards for food safety. Over the years this legislation has grown and become more specific, extending even to all industrial and handicraft activities concerning foods and the obligation to develop a programme of self-inspection, and it has also indicated a system with which to refer for its implementation (EU directive 43/93/CEE "hygiene of food products", received in Italy with the Legislative Decree of 26 May 1997, No. 155). Apart from specific norms on food hygiene, the legislative evolution at the Community level, to the end of major contribution to public health protection, has also taken into consideration zoonotic, or potentially so, agents. To that end the formulation of the (CE) Regulation No. 99/2003 concerning the "measures of surveillance of zoonotic and zoonotic agents" was reached and the (CE) Regulation No. 2160/2003 "on the control of salmonella and other specific zoonotic agents present in foods". Moreover, the (CE) Regulation No. 2073/2005 of 15 November 2005, attachment I, sets the criteria for safety relative to the microbiological load of food products, in particular as far as the presence of pathogenic micro-organisms are concerned. This regulation, apart from stabilising microbiological criteria, sets the norms for implementation which the operators in the food sector must respect with regard to the applications of general and specific hygienic measures (art. 4 of the CE Regulation No. 852/2004). Coming into effect the 1st of January 2006, the CE Regulation No. 2073/2005 harmonizes on a European level the microbiological criteria, prior to then defined autonomously by individual Member States, applicable to the food produced and in free circulation within the Common Market. The aim of the present research has been to evaluate the microbe contamination of samples of poultry meat and of the related products deriving from them, consigned to the Local Health Organisation, and from private farms for self-inspection in the Province of Milan.

Material and Methods

The research was carried out at the laboratories of food Microbiology at the headquarters in Milan at the Istituto Zooprofilattico of Lombardy and Emilia Romagna in the years from 2005-2008, and it has taken into consideration the consignment of meat and raw products of the ASL, conducted according to the "Regional plan of programming and coordination of interventions relating to official control of products originating from animals" edited by the General Management of Health for the

Lombardy Region and by the individual companies for self-inspection.

The microbiological analyses that were executed, of a qualitative and quantitative type, were conducted following the methodology set forth by Zavanella (2000) and accredited laboratory methodology and, when required by regulation, the ISO methods set forth in Regulation CE No. 2073/2005.

QUANTITATIVE ANALYSES

In the quantitative microbe research the following bacteria were searched for, expressed in UFC/g of the sample: total microbial count, Coliforms, *E. coli*, *S. aureus*, Faecal Streptococci, Sulphate-reducing Clostrides, anaerobes and *B. cereus*. The quantitative research for *Listeria* was effectuated solely in the event of a positive result from the qualitative research.

QUALITATIVE ANALYSES

For this type of analysis, with the entry in force of Regulation (CE) No. 2073/05, it is necessary for the official/legal samples, in which research for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* are the subject, the application of the standardised testing method (ISO), as set forth in the above-cited Regulation. For the genus *Salmonella* we proceeded, in the case of positive results, to a successive identification of the species. For the samples not subject to this obligation, we resorted to equivalent accredited methods (Zavanella, 2000).

Results and discussions

The study has taken into consideration all the meat, poultry-based products, turkey and quail samples, arriving at the laboratory during the period from 01/19/05 to 10/30/08.

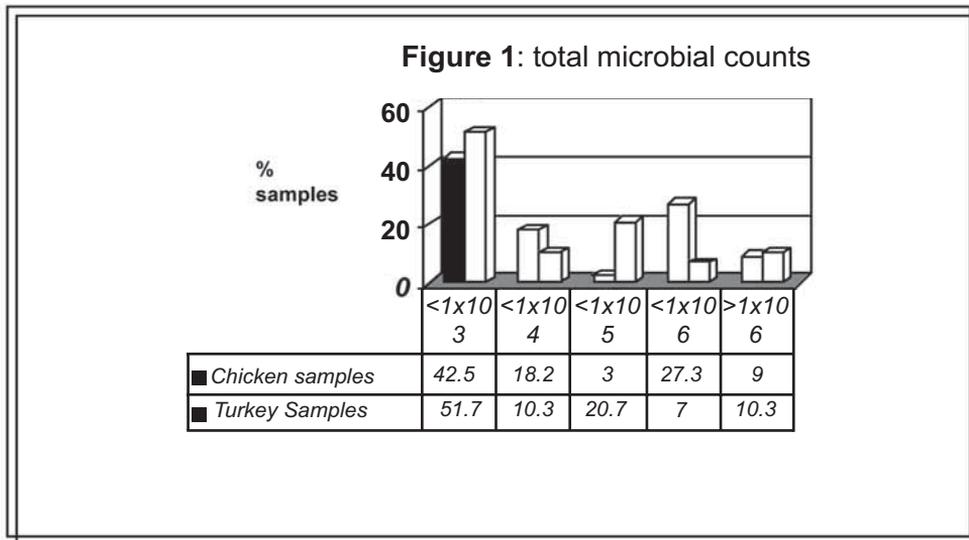
There were examined: 180 chicken samples (forequarters, leg, whole chicken, breast, filet, muscle, wings and roast), 66 turkey samples (muscle, thigh, breast, leg, wing, roast, cutlet and sausage), 5 quail samples (muscle).

In all, controls were conducted on 251 samples for a total of 550 analyses, inasmuch as not all the same number of analyses was conducted on all samples.

With regard to total microbial counts, almost half of the controlled samples of chicken and turkey show a low contamination (< 1000 UFC/g) and only a few samples had high microbe contamination (Figure 1); in particular, the maximum value found is of 6×10^8 UFC/g in a turkey cutlet sample. It is to be noted, from a legislative point of view, there have been no reference limits established specifically regarding poultry meats. The Regulation CE 2073/2005 refers solely the values of total bacterial contamination regarding minced meat and meat preparations that must be within a range of $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ UFC/g. These data, however, coincide with that reported in the bibliography (Pasqual Anderson, 1992; Tompkin, 1983) whereas they are shown to be much higher with respect to that recently found by Teldeschi (2002) in samples of meat from chicken and products derived from chicken.

With reference to *Coliform* totals, 70% of the chicken samples show a load < 30 UFC/g, and only 13% have loads superior to 100 UFC, for a maximum of 3000 UFC in a chicken leg sample. These results are super-imposable with regard to turkey, apart from a sample of cutlet in which there was a load of 22×10^5 UFC/g.

For *E. coli* the analyses presented results lower than the threshold level of the analyses (<30UFC/g) in more than 90% of the samples. The few positive samples, however, remain within the limits set by Regulation CE 2073/2005 with regard to preparations



based on meat. Our results are shown to be lower than those recently reported by De Giusti *et al.* (2007).

95.3% of the analysed samples do not demonstrate contamination by *Staphylococcus aureus*, while the remaining 4.7% demonstrate low contamination equal to 30 UFC/g (chicken muscle and turkey leg). Vural *et al.* (2006) reported positive in 65% of the poultry samples while De Giusti *et al.*, (2007) did not find detectable loads. In the United States contamination by these bacteria involves only 6.4% of the samples (Jackson *et al.*, 2007). The analyses have not shown *Clostridium perfringens* and *B. cereus* (limits of the analyses <30 UFC/g). The Sulphate-reducing Clostrides anaerobes, in this case *C. perfringens*, are reported in moderate quantities by Lindblad *et al.* (2006) and agree with our results just as it also does with respect to *B. Cereus*.

With regard to *Salmonella* spp., only two samples (both chicken legs) in 180 (circa 1.1%) gave positive results: one to *S. typhimurium* and one to *S. enteritidis*; only one turkey sample resulted positive, however, to *S. blokley* and two out of five of the quail samples analysed resulted positive to *S. typhimurium*. Also Lindblad *et al.* (2006) reports a contamination in the carcasses of chicken slaughtered in Sweden inferior to 0.8%. This low prevalence was expected because the poultry industry is made up of groups typically integrated with a pyramidal structure at the top of which there are players that are kept *Salmonella free* (Ceruti *et al.*, 2003, 2004). Around 3% of the samples analysed resulted positive to *Listeria monocitogenes* but within the limits of law (Regulation CE 2073/2005) recently fixed at 100 UFC/g. The search for *Campylobacter* thermophiles involved only 50 samples and only 5 were positive. This data contrasts with the data of Ricci *et al.* (2006) which during a focused monitoring plan found very high prevalences both by cloacal swabs (83.33% of samples were positive) and directly from carcasses (77.9% prevalence); the isolated strains belonged prevalently to the species *C. jejuni*. The sampling, however, was executed on carcasses removed directly from slaughter without refrigeration or freezing. These latter two systems of conservation

appear to determine a notable reduction in the contamination of meats. Therefore, on the one hand the data probably obtained overestimated results with respect to actual contamination in poultry found in commerce, but on the other hand, however, it must not be forgotten that *Campylobacter* is a micro-organism characterised as infectious to man in low doses and, therefore, a few hundreds of UFC can be sufficient to cause alimentary toxic infection.

Conclusions

The results obtained in the present research are in line with or even inferior to those reported in the cited bibliography and fall within very high qualitative parameters, clearly within the limits set by national legislation. Such results should not be surprising considering the increased attention of the poultry industry toward the preventive and prophylactic systems, both during factory farming of the poultry species for meat, and during the slaughtering phase and preparation of their products, thus confirming the efforts made to pursue the objectives proposed by the HACCP system, by the strict bio-safety standards adopted and the principle of control of the supply chain "from farm to table". With regard to Salmonella, the prevention starts already at the breeding of the poultry which, besides being tested, are subjected to specific immunisation plans, overall for infections by *S. enteritidis* and *S. gallinarum*, in putting into action all that is planned also by the Regulation (CE) No. 2160/2003 on the control of salmonella and other zoonotic agents specifically present in food. In conclusion, we believe it is necessary that the hygienic-sanitary quality of poultry meats produced in our territory are to be considered optimum and in conformance with the provisions of legislation currently in force.

Bibliography

- Ceruti R., Gavazzi L., Manarolla G., Stonfer M., Gallazzi D., Grilli G. (2003) "Salmonella spp. in broiler flocks and hatcheries in northern Italy: 2 years of bacteriological monitoring". Proc. the Fifty-Second Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, 8-11 March, 2003
- Ceruti R., Gavazzi L., Ferrazzi V., Gallazzi D., Grilli G. (2004) "Presenza di *Salmonella* spp. nell'allevamento del pollo riproduttore pesante" ("Presence of *Salmonella* spp. in heavy chicken reproduction farming"). IV Workshop Nazionale Enter-net Italia, Sistema di Sorveglianza delle Infezioni Enteriche – Diagnostica ed Epidemiologia delle zoonosi trasmesse da alimenti (*Surveillance System for Enteric Infections - Diagnosis and Epidemiology of zoonosis transmitted by foods*), Rome, Istituto Superiore di Sanità, 25-26 November, 2004: 38
- De Giusti M., Tufi D., Marinelli L., Aurigemma C., Marzuillo C., Boccia A., (2007) "Qualità microbiologica di produzioni avicole." ("*Microbiological quality in poultry production*") Atti VI Workshop Nazionale Enter-net Italia, Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, (*Surveillance systems for enteric infections*) 17-18 May, Rome
- Lindblad, M.; Lindmark, H.; Lambertz, S. T.; Lindqvist, R. (2006) "Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses", Journal of Food Protection 69 (12) : 2875-2882.
- Pasqual Anderson M.R. (1992) "Metodologia analítica para alimentos y bebidas" Analytical methodology for foods and drinks), Microbiologia alimentaria (*Alimentary microbiology*) 163-170, Madrid.

Regulation (CE) of 15 November, 2005 No. 2073/2005 of the Commission “Sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”. (*On microbiological criteria applicable to alimentary products*).

Regulation (CE) of 17 November, 2003 No. 2160/2003 of the European Parliament and Council Parlamento Europeo e del Consiglio “sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti (*on the control of salmonella and other zoonotic agents specifically present in foods*)

Ricci A., Amato S., Barco L. (2006) “Studio sulla prevalenza di *Campylobacter* spp. In allevamenti di polli da carne della regione Veneto” (*Study on the prevalence of *Campylobacter* spp. In farms of broiler chickens in the Veneto Region*) Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Atti XLIV Convegno Nazionale Associazione Scientifica di Avicoltura, 30 March, Forli,

Teldeschi E. (2002) “Valutazione di alcuni parametri qualitativi del pollo macellato” (*Evaluation of some qualitative parameters of chicken carcasses*) Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria.

Tompkin R.B. (1983) “Indicator organisms in meat and poultry products”, *Food Technology* (June) : 107-110.

Vural, A.; Erkan, M. E.; Yesilmen, S. (2006) “Microbiological quality of retail chicken carcasses and their products in Turkey”, *Medycyna Weterynaryjna* 62 (12) : 1371-1374.

Zavanella M. (2000) “Metodi per l’analisi microbiologica degli alimenti”, (*Methods for the microbiological analysis of foods*) ed. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche – Brescia.

DIFFUSION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS NETB POSITIVE STRAINS IN HEALTHY AND DISEASED CHICKENS

Drigo I., Agnoletti F., Bacchin C., Guolo A., Cocchi M., Bonci M., Bano L.

Laboratorio di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy

Corresponding author: Dr. Ilenia Drigo. Laboratorio di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Viale Brigata Treviso 13/a, 31100 Treviso, Italy. Tel. +39 0422 302302. Fax: +39 0422 421154 - idrigo@izsvenezie.it

Abstract

For over 30 years α toxin was considered the key virulence factor responsible for the appearance of necrotic enteritis (NE) in chickens but, recently, a new toxin related to the occurrence of NE, called NetB, has been described. The aim of this work was to evaluate the CP toxin-type and the *NetB* gene presence in strains collected from chickens affected or not by enteric diseases. 107 strains were tested: 30 isolated from chickens affected by NE, 54 from subjects affected by other enteric pathologies and 22 from healthy animals. All strains resulted toxin-type A and 26.17% of these was positive also for β 2 toxin gene. No strains were positive for *cpe* gene. 27% (29/107) of CP was *NetB* positive and 93% (27/29) of these was isolated from birds affected by intestinal disorders. 16 *NetB* positive strains were obtained from chickens affected by NE (16/30), 9 from animals affected by other intestinal disorders (9/54) and 4 from healthy animals (4/22). A significant difference between the number of *NetB* positive strains isolated from animals affected by NE and healthy chickens has been observed ($p=0.014$). However, the finding that the 17.4% of strains isolated from healthy chickens was also positive for *NetB*, confirm that other virulence factors could play an important role on NE appearance.

Key Words: *Clostridium perfringens*, NetB toxin, chickens.

Diffusione di ceppi di *Clostridium perfringens* NetB positivi in polli sani ed affetti da enterite.

Riassunto

La tossina α prodotta dai ceppi di *Clostridium perfringens* (CP) è stata considerata per anni come il principale fattore di virulenza dell'enterite necrotica (EN) ma la recente scoperta della tossina NetB ha indotto a riconsiderare l'eziopatogenesi di questa patologia. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la presenza del gene *NetB* in ceppi di campo di CP isolati da animali sani ed affetti da enterite. A tale scopo 107 ceppi di CP sono stati tossinotipizzati ed è stata valutata la presenza dei geni codificanti le tossine β 2, NetB ed enterotossina. 30 di questi ceppi sono stati isolati da polli affetti da EN, 54 da animali affetti da patologie enteriche diverse dalla EN e 22 da animali sani. Tutti i ceppi sono risultati di tossinotipo A ed il 26,2% di questi era anche positivo per il gene *cpb2* (tossina β 2). Nessun ceppo è risultato positivo per la presenza del gene codificante l'enterotossina (*cpe*). Il gene *NetB* è stato rilevato nel 27,1% dei ceppi in esame e il 93,1% di questi ceppi positivi era stato isolato da animali affetti da EN. L'analisi statistica dei dati ha messo in evidenza che il numero di ceppi *NetB* positivi è più alto negli animali

affetti da EN rispetto agli animali sani (53,3% verso 16,7%, $p=0,014$); tuttavia, l'isolamento di ceppi positivi a *NetB* anche da animali sani suggerisce che nell'eziopatogenesi dell'enterite necrotica sono coinvolti anche altri fattori di virulenza.

Parole chiave: *Clostridium perfringens*, tossina NetB, pollo.

Introduction

Clostridium perfringens (CP) is an important enteropathogenic agent in animals and humans. The differential production of the four major toxins (α , β 1, ϵ , and ι) is used to classify strains into five toxin-types. Some CP strains are able to produce two other toxins, β 2 and enterotoxin, that have an important role in the pathogenesis of intestinal disorders in animals (Baums *et al.*, 2004). In poultry, CP is well known as the causative agent of both acute and sub clinical necrotic enteritis (NE). Acute NE is characterized by high mortality rates without premonitory signs. In sub-clinical NE the intestinal mucosa damage is limited and this condition is characterized by malabsorption with consequent reduced weight gain and increased feed-conversion ratio (Kaldhusdal *et al.*, 2001). Historically, the α toxin has been recognized as the key virulence factor in this type of pathology but Keybourn and co-workers (2006), using α -toxin knock-out mutant of CP, brought evidences that it is not an essential virulence factor in NE. The same Authors in 2008 described a novel toxin, NetB, that displays a moderate amino acid sequence similarity with CP β 1 toxin and that seems to be expressed in most strains isolated in NE outbreaks (Keybourn *et al.*, 2008). However, the role of this new pore forming toxin in NE appearance is still under debate. Recently, Martin *et al.* (2008) demonstrated that *NetB* gene is expressed, although in a low incidence, also in healthy chickens and only in 58.3% of NE affected animals.

The aim of our study was to evaluate the presence of genes coding for α (*cpa*), β 1 (*cpb1*), ϵ (*etx*), ι (*cpi*), β 2 (*cpb2*), enterotoxin (*cpe*) and *NetB* toxins in CP field strains collected from healthy chickens and from subjects affected by enteric diseases.

Material and methods

Strains and growth conditions. 107 CP field strains were analyzed, 83 obtained from broilers and 24 from layers. 30/107 strains were isolated from birds affected by NE, 54/107 from animals with intestinal diseases not ascribable to NE and 22/107 from healthy ones. All strains were obtained streaking on Perfringens Agar Base (Oxoid) 0.1 ml of 24 h broth (Cooked Meat medium, Difco) previously inoculated with intestinal samples. CP ATCC 27324 (toxin-type E + enterotoxin), CCUG 2036 (toxin-type C), CCUG 2037 (toxin-type D), ATCC 10543 (toxin-type A+ β 2) were used as reference strains. All strains were incubated in anaerobic conditions at 37 °C for 48 hours.

DNA extraction. Five colonies of each CP strain included in the study were recovered from the agar plate and the DNA was extracted with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions.

Toxin coding gene detection. One multiplex PCR for *cpa*, *cpb1*, *cpetx*, and *cpi* genes and three other PCR for *cpb2*, *cpe* and *NetB* genes detection were used (Yoo *et al.*, 1997; 1997; Baums *et al.*, 2004; Keyburn *et al.*, 2006). The sequencing of the *NetB* amplified product confirmed that the targeted gene was correctly amplified with the PCR assay.

Parasitological examination. Intestinal mucosa of all chickens was scraped in different districts and observed by optic microscope searching for protozoa and helminthes.

Statistical analysis. Fisher's exact test was used to estimate the association between *NetB* gene positivity and NE appearance.

Results and discussion

All CP field strains were positive for α toxin (toxin-type A) and the 26.2 % (28/107) of these was positive also for the *cpb2* gene without significant differences between healthy and sick animals. None of the strains carried the *cpe* gene. 27% (29/107) CP were *NetB* positive and 93% (27/29) of these was isolated from birds affected by intestinal disorders, 16 from birds affected by NE and 9 from animals affected by other enteric pathologies. Only 4/22 isolates obtained by healthy animals carried *NetB* gene. The statistical analysis demonstrated that the number of *NetB* positive strains is higher ($p=0.014$) in chickens affected by NE than in healthy ones, and the difference was more evident ($p=0.0079$) when only CP isolated from animals affected by NE and tested negative at the parasitological examination were examined. Similar results were obtained when we analyzed separately the strains isolated from broilers where the disease has a greater economic impact compared with layers. 23/83 CP were positive for *NetB* gene, 14 were obtained from broilers affected by NE but only 1 from healthy birds. The data analysis underlined that the CP *NetB* positive strains are also in this case more frequent in animals affected by NE with a p value of 0.027. The p value reached the 0.0019 when only strains isolated from animals affected by NE and tested negative at parasitological examination were taken into consideration (table 1).

Table 1. Origin and number of *Clostridium perfringens* field strains tested for major toxin coding genes and for *NetB* gene. (EN=chickens affected by necrotic enteritis; E=chickens affected by other enteric diseases; H= healthy animals)

		N°	Toxin-type A (%)	Toxin-type A+ β 2 (%)	<i>NetB</i> positive (%)
Broilers and layers		107	79 (73.8)	28 (26.2)	29 (27.1)
107	NE	30	26 (86.7)	4 (13.3)	16 (53.3)
	E	54	41 (75.9)	13 (24.0)	9 (16.7)
	H	22	12 (52.2)	11 (47.8)	4 (17.4)
Broilers		83	66 (79.5)	17 (20.5)	23 (27.7)
83	NE	28	24 (85.7)	4 (14.3)	14 (50.0)
	E	44	36 (81.8)	8 (18.2)	8 (18.2)
	H	11	6 (54.5)	5 (45.4)	1 (9.1)

Conclusion

In conclusion, all CP isolates from Italian poultry flocks, as previously reported, belong to toxin-type A (Drigo *et al.*, 2008). A relatively high percentage of isolates carry the β 2 toxin gene with no significant differences between healthy and sick animals. The absence of *cpe* gene lead to suppose that chickens products do not represent an important risk factor for transmission of enteropathogenic CP to humans. A difference between the number of *NetB* positive strains isolated from animals affected by NE

and healthy chickens has been found. However, the percentage of positive strains in NE isolates was only 53.3% and, in addition, even if in low percentage (17.4%), CP that carry *NetB* gene were isolated also in healthy animals. Our results are in agreement with the data obtained by Martin *et al.* (2008) and, though they confirm the involvement of *NetB* toxin in the pathogenesis of NE, prompt to consider that also other pathogenic mechanisms could play an important role on NE appearance.

References

- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin-genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 100:11-16.
- Drigo, I, Agnoletti, F., Bacchin, C., Bettini, F., Cocchi, M., Ferro, T., Marcon, B., Bano, L., 2008. Toxin-genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. *Ital J. Anim. Sci.* 7: 397-400.
- Kaldhusdal, M., Schneitz, C., Hofshanger, M., Skjerve, E., 2001. Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian. Dis.* 45: 149-156.
- Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E, Williamson, M.M., Award, M.M, Rood, J.I., Moore, R.J., 2006. Alpha Toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74:6496-6500.
- Keyburn, L., Boyce, J.D, Vaz, P, Bannam., T. L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J. I, Moore, R. J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: 0001-0011.
- Martin, T.G., Smyth, J.A., 2008. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet. Microbiol.* (In press).
- Yoo, H. S., Lee, S. U., Park, K.Y., Park, Y. H., 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35:228-232.

INVESTIGATIONS OF SOME PARAMETERS OF NATURAL IMMUNITY IN MEAT TURKEYS REARED OUTDOORS

Franciosini M.P.¹, Casagrande Proietti P.¹, Moscati L.², Battistacci L.², Pela M.² and Tacconi G.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria Università di Perugia*

² *IZS dell'Umbria e delle Marche, Perugia (Italy) Via G. Salvemini, 2 -06126 - Perugia*

Corresponding author: Maria Pia Franciosini, Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via San Costanzo 4, 060126, Perugia, Italy-Tel: +39 075 5857748-Fax: +39 075 5857738-Email:mariapia.franciosini@unipg.it

Abstract

The progression of some parameters of natural immunity in meat turkey reared outdoors was investigated. The levels of the haemolytic complement were lower than those obtained in commercial turkeys and in turkeys reared in a controlled environment during one of our previous investigations. The weather conditions could have influenced the trend of the haemolytic complement in turkeys selected for high meat production and kept outside, underlining the possible importance of the rearing system.

Key words : meat turkeys, natural immunity, haemolytic complement

Riassunto

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'andamento nel tempo della concentrazione ematica di alcuni parametri di immunità naturale in tacchini da carne, allevati all'aperto. I valori del complemento emolitico, risultati più bassi di quelli evidenziati nel corso di una precedente ricerca in tacchini commerciali e in tacchini mantenuti in ambiente controllato, possono essere giustificati dalle condizioni meteorologiche che potrebbero influire anche in maniera consistente in ibridi "spinti" geneticamente, allevati all'aperto.

Parole chiave : tacchino da carne, immunità naturale, complemento emolitico

Introduction

Welfare in animal farming is one of the main topics of both European and National Legislation; its aim is to ensure acceptable welfare levels along all stages of the production cycle in order to limit environmental stress effects. Monitoring of natural immunity parameters can give precious information on the welfare and on the health of animals.

Chronic stress can influence the natural immune system predisposing the animals to conditioned pathologies since it represents the first and rapid immune response against extraneous organisms (Kimbrell and Beutler, 2001) .

In several animals the importance of some parameters of innate immunity (serum bactericidal action , complement activity and lysozyme) in relation to management conditions has been demonstrated. The alteration of value of bactericidal activity in

replacement gilts expressed the adjustment to a new environment (Moscati et al., 2004). Literature regarding the adjustment of natural immune response in relation to different rearing systems in birds is scarce (Sotirov et al,1998 Skeeles et al., 1980) . In one of our previous works (Moscati et al., 2008) we investigated the level of the some serological parameters (serum bactericidal and complement activity and lysozyme) in turkeys from intensive farms and in turkeys kept in experimental conditions in order to evaluate whether and how the tipology of rearing system can affect the non adaptive immune system. The aim of this work was to investigate the same parameters in outdoor turkeys and to evidence the possible differences in values previously detected in meat turkeys reared intensively and in controlled environment .

Materials and Methods

The investigation was performed in 10 turkeys (UBT hybrids), collected from a commercial farm at one day and reared outdoor, in a period ranging from October to January 2008, since they were 2 weeks old .In order to determine bactericidal, complement activity, and lysozyme concentration, blood samplings were collected at : one day (d) (T0), 20 d (T1), 40 d (T2),60 d (T3) , 80 d (T4) and 100 days (T5)

The haemolytic complement assay was carried out in microtitre plates following method previously described (Barta and Barta 1975)

Serum lysozyme was measured by the lyso-plate assay (Osserman and Lawlor, 1966) and its concentration value was expressed in µg/ml. The serum bactericidal activity was valued following conventional procedures (Amadori et al., 1997). Statistical analysis were performed using the Student's T-test and expressed as mean ± standard deviation (SD). Differences between means were significant at $P \leq 0,001$

Results an Discussion

The results are summarized in table 1 and figure 1. Bactericidal activity and haemolytic complement increased with age (11,92 to 68 and 3,7 to 49 respectively). The values detected at T5 were significantly higher than T4 values. Lysozyme concentration does not present age related variations. In our work the haemolytic complement concentration and bactericidal activity rose with age in relation to the development of the natural immune response in agreement with what observed in other studies (Moscati et al., 2008; Sotirov et al,1998 Skeeles et al., 1980) It should be stressed that the value of haemolytic complement concentration was significantly lower than those determined at 50 and 100 days in turkeys kept in experimental and commercial conditions during one of our previous investigation (Moscati et al., 2008). It can be explained by the fact that the weather conditions can influence these hybrids selected for high meat production, as observed in commercial hybrid pigs in outdoor breeding farm (Battistacci et al., 2007). Lysozyme concentration showed a constant trend independent of the age, as observed in swine (Sensi et al., 2006) and in turkeys in our previous studies (Moscati et al., 2008). Conversely chickens showed a high value of the serum lysozyme at hatching (56µg/ml) , that decreased progressively with age (Mughetti et al., 2007).

Conclusion

The literature regarding changes of the parameters of the non adaptive immunity is scarce in birds (Sotirov et al,1998 Skeeles et al., 1980). In this work it is likely that

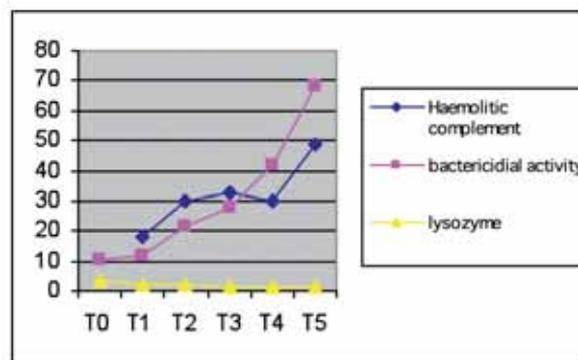
the autumnal and winter conditions influenced the haemolytic complement in turkeys, selected for high production and used to being reared indoors. The result obtained in turkeys reared intensively and in optimal environment showed no significant differences in bactericidal activity, lysozyme and haemolytic complement concentrations. However their evaluation, though it is able to give a general idea about the health status of the animal, can be reliable as a welfare marker only if associated with other productive and sanitary indicators. Further studies should be performed in chickens to confirm the decrease of lysozyme with the age.

Table 1 Medium value (\pm SD) of the bactericidal activity, lysozyme and haemolytic complement.

Samples	Bact. activity %	Lysozyme me μ g/ml	Haemolytic Compl. CH50
T0	10,17	2,32	3,7 C
T1	11,92	1,85	18,30 D
T2	21,73	1,79	29,86
T3	27,61	1,49	32,86
T4	41,82 A	1,57	29,76 E
T5	68 B	1,6	49 F

A,B; C,D; E,F $P \leq 0,001$

Figure.1 Progression of the haemolytic complement, bactericidal activity and lysozyme values in turkeys at different ages



References

- Amadori M, Archetti I.L, Frassinelli M., Bagni M., Olzi E., Caronna M. and Lanterni M., 1997. An immunological approach to the evaluation of welfare in Holstein Frisian cattle. *J. Vet. Med. B* 44. 321-327
- Barta V. and Barta O. 1975. Chicken hemolytic complement: optimal condition for its titration. *Immunol. Commun.* 4:337-351

- Battistacci L., Sensi M., Timi M., Marchi S., Moscati L. 2007 “ Adaptation ability of natural immune system in Cinta senese and commercial hybrid pigs in outdoor breeding farms” 6th International Symposium on the Mediterranean Pig, October 11- 13 2007 Capo d’orlando (ME)
- Kimble D.A. and Beutler B. 2001 .The evolution and genetics of innate immunity. *Nat.Rev. Genet.* 2(4):256-267
- Moscati L., Sensi M., Timi M., Maresca C. and Battistacci L.2004.Benessere Animale: stress da adattamento in un allevamento di suini a ciclo aperto in Umbria. Atti VI° Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.. Abano Terme (PD), 159-160
- Moscati L., Battistacci L.,Casagrande Proietti P, Bazzuchi M , Canali C., Franciosini MP VII International Symposium on Turkey Diseases, Berlino 19-21 Giugno 2008, pp.7-8
- Mughetti L., Battistacci L., Tralza Marinucci M., Acuti G., Antonini C., Moscati L. 2007. Impiego di lino estruso nella dieta estruso: effetti sulla immunità aspecifica del pollo da carne. Atti del XLVI Congresso SIPA
- Osserman E. F and Lawlor D.P 1966 Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 124, 921- 952
- Sotirov L., Lalev M., Oblakowa M., Porfirova Z., Tanchev S. and Nikolov G. 1998 Lysozyme and complement activity in different turkey breeds. *Revue Med. Vet.*, 149,4, 309-312
- Sensi M., Moscati L , Costarelli S. , Pistidda E., Marchi S. , Battistacci L.“Definizione di un sistema obiettivo di valutazione dell’allevamento del suino dal punto di vista sanitario e del benessere animale nel contesto territoriale dell’attività svolta dal Servizio Sanitario Nazionale: prototipo sperimentale” IPVS 2006 proceedings. Vol. 1 - p287.
- Skeels J., Stewart R.G., Brown J.,Page R.K. and Russel I.D. 1980 Hemolytic complement activity in broiler chickens and turkeys. *Poultry Science*, 59:1221-1225 .

PATHOGENICITY MARKERS OF *CLOSTRIDIUM* SPP. IN COMMERCIAL TURKEYS.

Saita M., Bano L.*, Gallazzi D.

Department of Veterinary Pathology, Hygiene and Public Health, University of Milan, Via Celoria 10, 20133 Milano, Italy, E-mail: daniele.gallazzi@unimi.it

** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso, Italy*

SUMMARY

Since growth promoters ban in Europe, enteritis of different aetiologies (virus, bacteria and protozoa) are increasingly becoming the main cause of economic loss in commercial turkeys production. This study is focused on typing of *Clostridium* spp. isolated from samples of jejunum and ileum of 82 birds out of 17 turkeys flocks. The birds were 6-day to 104-day old, both male and female, with enteric disorders. The presence of toxin NetB was investigated. Multiplex PCR to detect cpa, cpb1, cpetx, cp1, cpb2 and cpe toxin genes were used for *Clostridium* typing. No lesions of necrotic enteritis were observed. *Clostridium perfringens* type A was isolated from 25 enteric samples, *Clostridium difficile* was found in 4 cases and *Clostridium sordelli* in one case. *Clostridium perfringens* was present from 6 to 104 days of age indicating its possible role in the enteric disorders of commercial turkeys. NetB toxin was found in no sample. 3 out of 4 isolates of *Clostridium difficile* were characterized by the presence of toxin genes.

RIASSUNTO

In seguito al bando europeo degli antibiotici promotori della crescita, le enteriti di differente eziologia (virus, batteri, protozoi) stanno diventando la principale causa di perdita economica nell'allevamento del tacchino commerciale. Lo scopo del presente lavoro è la tipizzazione di *Clostridium* spp. isolati da campioni di digiuno ed ileo di 82 tacchini provenienti da 17 allevamenti. Gli uccelli, sia maschi che femmine, avevano un'età compresa tra i 6 e i 104 giorni ed avevano problemi enterici. E' stata ricercata la presenza della tossina NetB. Sono inoltre state effettuate Multiplex PCR per rilevare la presenza dei geni tossigeni cpa, cpb1, cpetx, cp1, cpb2 and cpe. Non sono state riscontrate lesioni ascrivibili ad enterite necrotica. *Clostridium perfringens* tipo A è stato isolato da 25 campioni enterici, *Clostridium difficile* è stato isolato in 4 casi e *Clostridium sordelli* in 1 caso. *Clostridium perfringens* era presente dai 6 ai 104 giorni di età indicando un suo possibile ruolo nei problemi enterici del tacchino. Non è stata riscontrata la presenza della tossina NetB. Tre dei 4 isolati di *Clostridium difficile* erano caratterizzati dalla presenza di geni tossigeni.

KEY WORDS: Turkey, clostridiosis, toxin

INTRODUCTION

The main *clostridia* responsible for a wide range of diseases in avian species are: *Clostridium colinum*, *C. botulinum*, *C. septicum* and *C. perfringens*, *C. fallax*, *C. novyi*, *C. sporogenes* and *C. difficile* (1).

Pathological signs are caused by the different toxins but in many cases cofactors such

as dietary ingredients or changes, severe stress, coccidiosis and other protozoal diseases of the intestinal tract or immunosuppressive infections can enhance the disease (1). *Clostridium perfringens* (CP) is often isolated from the intestinal tract of healthy birds but can also cause outbreaks of disease in poultry, and especially in broiler and turkey flocks. CP is a Gram-positive, spore forming and anaerobic bacterium responsible for a wide range of diseases in humans and animals. Its pathogenicity is associated with the production of 17 toxins, of which α , β , ϵ and ι are the major lethal ones (2). A commonly used classification scheme divide CP isolates into five types (A-E) on the basis of their capability to produce the major lethal toxins (2). Some CP strains, in addition to α toxin, produce β_2 and enterotoxin: two toxins that have been proposed as being important in the pathogenesis of intestinal disorders in animals and humans respectively (3, 4, 5). Clostridiosis occurs as acute or subclinical disease. The acute clinical disease is characterized by necrotic enteritis (NE). Intestinal focal necrosis and hepatitis are typical signs frequently associated with subclinical clostridiosis (6). The role of CP toxin types in the pathogenesis of NE in poultry is still not clear. Studies conducted in Finland, Sweden, Belgium and Denmark demonstrated that CP isolated from chickens affected by NE, belong to toxin type A (6; 7, 8, 9,10) and demonstrated that α toxin is not essential in causing NE in broilers. Very few studies are focused on turkeys although, since the growth promoters ban in Europe in 2006, it has become a pathology of major concern. Recently, NetB, a novel toxin that is associated with broiler NE, has been described (10). The toxin was identified using screens for proteins from the supernatant of *C. perfringens* cultures that were cytotoxic for chicken hepatocellular carcinoma cells (LMH) in vitro. The aim of this study was to perform toxin genotyping of CP field strains collected from the intestines of diseased turkeys by multiplex PCR for detection of α , β , ϵ , ι , β_2 , NetB and enterotoxin genes.

MATERIALS AND METHODS

Birds

Eighty-two birds from 17 commercial turkeys flocks showing enteric disorders were humanly euthanized and necropsied. The turkeys were 6-day to 104-day old, both male and female.

Strains and growth conditions

All strains were obtained streaking on Perfringens Agar Base (Oxoid) 0.1 ml of 24 h broth (Cooked Meat Medium, Difco) culture of jejunum and ileum fragments (5 cm back and 3 cm after the Merkel's diverticulum) collected from sick commercial turkeys. CP ATCC 27324 (toxin-type E + enterotoxin), CCUG 2036 (toxin-type C), CCUG 2037 (toxin-type D), ATCC 10543 (toxin-type A+ β_2) were used as reference strains. All strains were incubated in anaerobic conditions at 37 °C for 48 hours.

DNA extraction

Colonies of each CP strain were recovered from the agar plate and the DNA was extracted with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions.

Toxin coding gene detection

One multiplex PCR for *cpa*, *cpb1*, *cptx*, and *cpi* genes and three single PCR for *cpb2* (2), *cpe* (11) and *NetB* (10) genes detection were used. PCR primers and fragment length are listed in table 1. The sequencing of the amplified product confirmed that the targeted *netB* gene was indeed amplified with the PCR assay.

Parasitological examination

Intestinal mucosa of all chickens was scraped in different districts and observed by optic microscope searching for protozoa and helminths (eggs and worms).

GENE	Primers	Sequence (5'-3')	Fragment lenght
cpa	cpa_F	GTT GAT AGC GCA GGA CAT GTT AAG	402
	cpa_R	CAT GTA GTC ATC TGT TCC AGC ATC	
cpb	cpb_F	ACT ATA CAG ACA GAT CAT TCA ACC	236
	cpb_R	TTA GGA GCA GTT AGA ACT ACA GAC	
cpetx	etx_F	ACT GCA ACT ACT ACT CAT ACT GTG	541
	etx_R	CTG GTG CCT TAA TAG AAA GAC TCC	
cpi	cpi_F	GCG ATG AAA AGC CTA CAC CAC TAC	317
	cpi_R	GCG ATG AAA AGC CTA CAC CAC TAC	
cpe	cpe_F	GGG GAA CCC TCA GTA GTT TCA	506
	cpe_R	ACC AGC TGG ATT TGA GTT TAA TG	
cpb2	cpb2_F	AGA TTT TAA ATA TGA TCC TAA CC	567
	cpb2_R	CAA TAC CCT TCA CCA AAT ACT C	
NetB	AKP78_F	GCT GGT GCT GGA ATA AAT GC	384
	AKP79_R	TCG CCA TTG AGT AGT TTC CC	

Table 1. Primers used to detect *C. perfringens* toxin coding genes

RESULTS AND DISUSSION

At necropsy, all 82 turkeys showed enteric lesions. In younger subjects (1 to 3 weeks) intestinal lesions were consistent with viral enteritis, a common finding in Italian flocks. In older turkeys (3 to 6 weeks of age) coccidiosis was diagnosed. Twenty-five (30.48%) out of 82, aged from 6 to 104 days old, were positive for *C. perfringens* type A. All strains resulted positive for α toxin gene (toxin-type A) and only 1 (1.2%) of these was positive also for β 2 toxin (toxin-type A+ β 2). No CP cpe-positive or NetB positive strains were detected. Four (4.8%) turkeys were positive for *C. difficile*. Among these, 1 was negative for both toxin genes while 2 were positive for TcdA and TcdB and 1 was positive only for TcdB. 1 (1.2%) was positive for *C. sordelli*.

The data highlight that the CP isolates included in the study were type A toxin positive and a relatively low percentage of isolates carried the β 2 toxin gene, irrespective of enteric lesions. No CP toxin type C were found also in birds affected by NE. Our findings confirm the most recent results reported from different countries and the data suggest that the role of CP type C should be reevaluated in the pathogenesis of NE. The presence of *Clostridium* spp. was often associated with other pathogens, such as viral enteritis in the first 3 weeks, coccidiosis between 3 and 5 weeks and hemorrhagic enteritis between 6 and 12 weeks of age.

CONCLUSIONS

These observations underline the importance of predisposing factors (nutrition, drug treatments, concomitant diseases) in poultry clostridiosis. It must be underline the presence of CP type A already in 6 days old turkeys. The role of this pathogen at such

LA NOSTRA COMPETENZA AL SERVIZIO DELLA VOSTRA PROFESSIONALITA'.

Intervet/Schering-Plough Animal Health: la gamma più completa di vaccini per l'avicoltura, prodotti innovativi espressione di una ricerca avanzatissima, assistenza tecnica e veterinaria di grande competenza e lunga esperienza con l'obiettivo di ottimizzare i vostri profitti. Intervet/Schering-Plough Animal Health: il vostro partner scientifico e in campo.

young age must be clearly understood but surely it could play an important role in developing enteric disorders. After the growth promoters ban in 2006, enteric imbalances are a main concern. The lack of NetB positive findings, which seems to play a major role in NE of chickens, is an important result as there is no data available for this toxin in turkeys. Moreover, the presence of *C. difficile* in 4 samples, 3 of them toxin genes positive, is quite interesting because of its potential zoonotic role.

REFERENCES

- Barnes E.M., Impey C.S., Cooper D.M., Manipulation of the crop and intestinal flora of newly hatched chick, *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 2426-2433, 1980.
- Meer, R. R., Songer, J., 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.* 58:702-705.
- Sarker, M. R., Carman, R. J., McClane, B.A., 1999. Inactivation of the gene (*cpe*) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two *cpe*-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol. Microbiol.* 33:946-958.
- Thiede, S., Goethe, R., Amtsberg, G., 2001. Prevalence of β 2 toxin gene of *C. perfringens* type A from diarrhoeic dogs. *Vet. Rec.* 149:276-274.
- Manteca, C., Daube, G., Jauniaux, T., Linden, A., Prison, V., Detileux, J., Ginter, A., Coppe, P., Kaeckenbeeck, A., Mainil, J. G., 2002. A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet. Microbiol.* 86: 191-202.
- Engström, B. E., Fermér, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Båverud, V., Gunnarsson, A., 2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and disease poultry. *Vet. Microbiol.* 94: 225-235.
- Nauerby, B., Pedersen, K., Madsen, M., 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *C. perfringens* isolates from chickens. *Vet. Microbiol.* 94:257-266.
- Heikinheimo, A., Korkeala, H., 2005. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:407-411.
- Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., 2006. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet. Microbiol.* 113:146-152.
- Keyburn, A. L., Sheedy, S. A., Ford, M. E., Williamson, M. M., Awad, M. M., Rood, J. I., Moore R. J., 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74:6496-6500.
- Baums, C. G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 100:11-16.

ANTIMICROBIAL MULTIPLE RESISTANCE OF AVIAN ESCHERICHIA COLI IN ALBANIA

Shtylla T.¹, Circella E.², Madio A.², Di Paola G.², Çabeli P.¹, Kumbe I.¹, Kika A.³, Camarda A.²

¹ *Veterinary Medicine Faculty, Agriculture University of Tirana, Albania*

² *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari*

³ *Natural Sciences Faculty, University of Tirana, Albania*

Corresponding Author: Prof. Antonio Camarda. Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia – Facoltà di Medicina Veterinaria, S.P. per Casamassima Km 3 - 70010 Valenzano (Bari), (Italy) - Tel./Fax. +39 080 4679910 - Email: a.camarda@veterinaria.uniba.it

Abstract

In this study 101 *E. coli* from broilers, laying hens, and turkeys death for colibacillosis coming from intensive and rural farms of Albania were tested for antimicrobial susceptibility toward 12 different molecules. An higher level of resistance has been observed for E (100 %) AMX (99, 1 %), TE 30 (96, 07 %), STR (93, 07 %) and N30 (85,15 %). A relevant resistance was detected for fluoroquinolones. Moreover the 73,33 % of *E. coli* resistant to at least one fluoroquinolone were also resistant to the 2 other checked fluoroquinolones. No evident differences were found between the *E. coli* from intensive and rural farms. Multiple antibiotic resistance was expressed by all the *E. coli* tested. The 23,63 % and 17,39% of *E. coli* from respectively intensive and rural farms were resistant towards all the tested drugs. These data lead to retain possible an incorrect use of antibiotics in poultry farms of Albania.

Key words: E. coli, poultry, Albania, antimicrobial resistance

Riassunto

In questa ricerca 101 stipiti *E. coli* isolati da broilers, galline ovaiole e tacchini morti per colibacillosi e provenienti da allevamenti e rurali dell'Albania sono stati testati per valutare la sensibilità nei confronti di 12 differenti antibiotici.

Un livello di resistenza elevato è stato riscontrato in particolare nei confronti di E (100 %) AMX (99, 1 %), TE 30 (96,07 %), STR (93,07 %) and N30 (85,15 %). Anche i fluorochinoloni (ENR, CIP5, MAR), si sono rivelati spesso inefficaci in vitro. Inoltre, il 73,33% dei ceppi resistenti ad almeno un chinolone manifestava resistenza anche nei confronti degli altri due testati.

Non sono state riscontrate sostanziali differenze tra i ceppi provenienti dagli allevamenti intensivi e quelli rurali. Resistenze multiple sono state osservate in tutti gli *E. coli* testati. Rispettivamente, il 23,63 % ed il 17,39% dei ceppi provenienti dagli allevamenti intensivi e rurali sono risultati resistenti a tutte le molecole testate. Questi dati fanno ritenere che in Albania sussista un uso poco accorto degli antibiotici negli allevamenti di pollame che riduce l'efficacia delle terapie nei confronti di *E. coli* ed amplifica rischio di immettere sul mercato prodotti con residui di farmaci.

Parole chiave: E. coli, pollame, Albania, antibioticoresistenza

Introduction

Albania is among the third world countries that during the past 15 years has developed a lot in animal production industries. At the present, the poultry production is ensured by six intensive eggs and broilers brands. Moreover, is very common in Albania the poultry rural and free range breeding, often to private consumption.

Colibacillosis is one of more diffused diseases both in intensive and rural Albanian poultry farms. The disease is economically relevant for poultry producers because it causes high mortality, increased condemnations and poor eggs quality respectively in broilers and laying hens flocks. Especially in the rural farms *Escherichia (E.) coli* infections influence seriously the production and the surviving of the birds because the biosecurity and the hygiene are frequently unheeded. The control of the disease is obtained using antimicrobials for therapy and prophylaxis.

Actually the administration of antimicrobials is very common in Albania and is frequently abused and applied without a real veterinary control, both in intensive and in rural farms.

This makes unlike a real reduction of the disease or his effective eradication.

This incorrect use of antibiotics may cause high level of resistance both in the pathogenic microorganisms (Amara et al. 1995) but also in the normal poultry microflora (Allan et al. 1993). These bacteria may also act as a possible source for the transfer of antimicrobial resistance to human pathogens (Bebora et al. 1994).

Currently no data are available on the resistance of (*E. coli*) isolated from poultry in Albania and consequently on the efficacy of the therapies applied for the treatment of the colibacillosis.

In this paper, for the first time, *E. coli* isolates from intensive and rural poultry farms were checked for antimicrobial resistance toward the antibiotics more frequently used in the therapy of the colibacillosis.

Materials and Methods

E. coli collection. The researches were performed on a total of 101 *E. coli* isolated from broilers, laying hens, and turkeys death for colibacillosis in 36 different intensive (n.7 from laying hens farms, n.5 from broilers farms) and rural poultry farms (n.12 from laying hens and n.13 from broilers/turkeys farms). In particular, n.55 and n.46 *E. coli* come from intensive and rural farms respectively. Birds were sampled from sept 2007 to dec 2008. All the suspected strain were isolated from liver or spleen. Each sample, was plated on Agar Mac Conkey (Oxoid) at 37°C for 24h. All the suspect bacterial colonies were isolated on nutrient agar and confirmed as *E. coli* by the API 20E Test (bioMerieux). Each *E. coli* strain was cultivated on Brucella Broth added with 20% glycerol and kept in criovials at -80°C until the execution of the following tests.

Antibiotic resistance evaluation. Laboratory tests were performed in accordance with the principles described in the standard method of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Drug resistance was tested by checking the *E. coli* isolates with the following range of antimicrobials with the Kirby-Bauer disk diffusion method (Bauer et al. 1966). The following panel of antimicrobial agents was used: 35µg Amoxicillin (AMX), 500µg Ciprofloxacin (CIP5), 50 µg Enrofloxacin (ENR 5), 10µg Gentamicin (GN 10), 50µg Colistin Sulphat (CS), 30 µg Tetracycline (TE 30), 25µg Trimetroprim sulphamethoxazole (STX), 10 µg Lynco-

spectin, 25µg Erythromycin (E), 10 µg Marbofloxacin (MAR), 10 µg Streptomycin (STR), Neomycin (N30, 30 µg).

Results and Discussion

As expected the highest rate of resistance has been against E (100 %). High levels of resistance have been observed for AMX (99,1 %), TE 30 (96,07 %), STR (93,07 %) and N30 (85,15 %). These results are alarming in particular for tetracycline and amoxicillin; these compounds, heavily used in the poultry industry in Albania, are currently of little efficacy in the treatment of *E. coli* infections in intensive and rural farms.

Gentamicin seems one of the more efficacious molecules, especially in the rural farms (table 1). A medium activity was expressed even from Colistin Sulphate (52,48 %) in comparison with the other very high resistance rates. As known this drug plays its activity in the intestinal tract meanwhile *E. coli* causes mainly an extra-intestinal infection in poultry (Barnes et al. 2003).

The results coming from fluoroquinolones test are very interesting; the avian *E. coli* isolates showed a resistance rate of 74,26 %, 69,31 %, 63,37 % respectively for CIP5, ENR and MAR. Moreover, the 73,33 % *E. coli* resistant to at least one fluoroquinolone were also resistant to the 2 other checked fluoroquinolones.

These resistance levels have been similar in broiler and layer intensively reared, and also in layers of rural farms (table 2). This result may be due to an uncontrolled drug availability even in rural owners.

There is a strong evidence that populations of *E. coli* Ciprofloxacin-resistant were selected in the poultry farms of Albania. This antibiotic is frequently used for the therapy of bacterial infections in humans.

Multiple antibiotic resistance was expressed by all the *E. coli* tested. In the intensive poultry farms the 23,63 % *E. coli* were resistant towards all the tested drugs.

The same multiple resistance *AMX, CIP5, CL50, ENR5, GN10, NE30, STX, TE30, L, E, MAR, STR* was also detected in 8 *E. coli* strains (17,39 %) from the rural farms. Moreover 11 strains (23,91%) showed were susceptible only to gentamycin.

The high prevalence of multiple resistance may be emphasized by the use of antimicrobials for preventive purpose. This practice is common in Albania and applied sometime to cover falls in the farms management.

Conclusions

The results of this study provide evidence for significant antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from poultry and suggest a possible incorrect use of antibiotics both in intensive and rural farms in Albania.

The high resistance rate observed lead to suppose their inefficacy during the outbreaks of the disease.

The inefficacy of fluoroquinolones observed in this study is of relevance; in fact some of these molecules are used for therapy in human.

A more accurate management of the poultry farms is essential to avoid an excessive use of antibiotics which may lead to multiple resistance development especially in birds with a longer production cycle. A strict surveillance of the use of drugs during the production cycles in the poultry farms is fundamental to reduce the risk of residues in eggs and meat.

References

1. Allan BJ, Van-den-Hurk W & Potter AA. 1993. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis.
2. Amara A, Ziani Z & Bouzoubaa K. 1995. Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Veterinary Microbiology* 43, 325–330.
3. Bauer Aw, Kirby Wmm, Sherris Jc, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*; 45: 493–496.
4. Bebora LC, Oundo JO & Yamamoto H. 1994. Resistance of *E. coli* strains, recovered from chickens, to antibiotics with particular reference to trimethoprim-sulfamethoxazole (Septrin). *East African Medical Journal* 71, 624–627.
5. Barnes H.J., Vaillancourt J.P., Gross W.B. 2003. Colibacillosis. In: Saif Y.M. (ed). *Diseases of Poultry*, 11th ed. Iowa State University Press., Ames, USA, pp 631-652

Table 1. Antimicrobial resistance of avian *E.coli* from intensive and rural farms

Antimicrobial agent (µg)	Intensive farms (n= 55)		Rural farms (n=46)	
	S	R	S	R
Amoxicillin (35)	0,00	100,00	2,17	97,82
Ciprofloxacin (50)	24,45	74,55	26,09	73,01
Colistin Sulphat (50)	54,54	45,46	50,00	50,00
Enrofloxacin (50)	20,10	70,90	32,61	67,39
Gentamicin (10)	46,46	54,54	71,74	28,26
Neomicin (30)	20,00	80,00	8,70	91,30
Trimetoprim S (25)	21,82	78,18	23,91	76,09
Tetracycline (30)	1,82	98,18	6,52	93,48
Lyncospectin(50)	23,64	76,36	21,74	78,24
Erithromycin(25)	0,00	100,00	0,00	100,00
Streptomycin(10)	5,45	94,56	8,70	91,30
Marbofloxacin(10)	34,55	65,45	39,13	60,87

Key words: S = sensitivity; R = resistance

Table 2: Antimicrobial resistance of *E.coli* from broilers/turkeys and laying hens reared in intensive and rural farms

Antimicrobial agent (μg)	Intensive farms (n= 55)		Rural farms (n=46)	
	Broilers/Turkeys <i>E. coli</i> (n=25)	Laying hens <i>E. coli</i> (n= 30)	Broilers/Turkeys <i>E. coli</i> (n=20)	Laying hens <i>E. coli</i> (n= 26)
Amoxicillin (35)	100,00	100,00	95,00	100,00
Ciprofloxacin (50)	76,00	73,33	50,00	92,31
Colistin Sulphat (50)	56,00	36,67	70,00	34,62
Enrofloxacin (50)	68,00	73,33	45,00	84,62
Gentamicin (10)	72,00	30,00	10,00	42,31
Neomicin (30)	88,00	73,33	90,00	92,31
Trimetroprim S (25)	88,00	70,00	40,00	88,46
Tetracycline (30)	100,00	96,67	95,00	92,31
Lyncospectin(50)	88,00	66,67	55,00	96,15
Erithromycin(25)	100,00	100,00	100,00	100,00
Streptomycin(10)	96,00	93,33	80,00	100,00
Marbofloxacin(10)	60,00	70,00	35,00	80,77

Key words: S = sensitivity; R = resistance

EVOLUZIONE ANTIGENICA DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE

Cecchinato M.^{1*}, Lupini C.², Ricchizzi E.², Brown P.³, Spada D.², Naylor C.J.³, Catelli E.²

¹ *Università di Padova, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

² *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

³ *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE Neston, United Kingdom*

**Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Università di Padova Tel: +39 049 8272968. Fax: +39 049 8272604. E-mail: mattia.cecchinato@unipd.it*

Introduzione

Metapneumovirus aviare (AMPV) è responsabile della Rinotracheite del Tacchino (TRT), e causa importanti perdite economiche in animali non vaccinati. Sono stati sino ad ora identificati, in base alle sequenze nucleotidiche, quattro sottotipi virali denominati A,B,C e D. Alla fine degli anni '80 sono stati messi in commercio vaccini vivi attenuati largamente impiegati per il controllo di tali infezioni. Tuttavia in campo si osservano ancora forme respiratorie dovute da AMPV. Varie ragioni sono state addotte a spiegazione dell'occorrenza di tali focolai tra cui vaccinazione eseguita male, scarsa durata dell'immunità e incompleta protezione tra i sottotipi (Naylor *et al.*, 1997; Van de Zande *et al.*, 2000) o riacquisizione di patogenicità del vaccino stesso (Catelli *et al.*, 2006). Ciò nonostante tali cause non spiegano esaurientemente il verificarsi di focolai di TRT in animali vaccinati correttamente e con vaccino appartenente al medesimo sottotipo virale causa del focolaio.

Dati epidemiologici sulla prevalenza di AMPV in allevamenti di tacchini da carne del Nord Italia hanno messo in evidenza come, dopo l'introduzione della vaccinazione di massa, il numero di positività per AMPV sia complessivamente diminuito negli anni in concomitanza con un aumento del numero di positività osservate in età avanzata (43-90 giorni di età), in gruppi vaccinati col medesimo sottotipo (Catelli, 2006). Il successivo sequenziamento completo del gene di adesione (G) di alcuni isolati responsabili di focolai tardivi in gruppi vaccinati, ha permesso di distinguerli nettamente dal ceppo vaccinale e da tutti i ceppi di AMPV italiani isolati prima del 2001 (Cecchinato *et al.*, 2007).

Allo scopo di determinare se le mutazioni osservate nei ceppi "più recenti" siano state sufficienti al virus per eludere l'immunità vaccinale è stata eseguita un'infezione sperimentale in tacchini vaccinati, inoculandoli con un ceppo isolato nel 2004 o con un ceppo del 1987, e valutando la protezione mediante misurazione della sintomatologia clinica e dell'eliminazione virale.

Materiali e metodi

Vaccino. Un vaccino vivo attenuato, costituito da AMPV sottotipo B, è stato somministrato mediante via oculare agli animali rispettando la dose raccomandata dalla ditta produttrice.

Virus. Per il challenge sono stati utilizzati: AMPV sottotipo B IT/Ty/Vr240/87 e IT/

Ty/205-16/04 isolati in Italia, rispettivamente nel 1987 e nel 2004, alla dose di 3.6 log₁₀ CD₅₀/soggetto.

Tacchini. Sono stati utilizzati tacchini commerciali di un giorno di vita, non vaccinati per AMPV, provenienti da un incubatoio che applica misure di biosicurezza elevate.

Piano sperimentale. I tacchini sono stati identificati con anello numerato al piede e introdotti in 3 differenti isolatori per pollame in numero di: 20 nell'isolatore A, 20 nell'isolatore B e 10 nell'isolatore C (controllo negativo). Ad un giorno di vita i tacchini dell'isolatore A sono stati vaccinati mentre gli altri (isolatori B e C) sono stati inoculati con acqua sterile. A 20 giorni di vita, metà dei tacchini dell'isolatore A sono stati scambiati con un egual numero di animali dell'isolatore B. Il giorno successivo i tacchini dell'isolatore A sono stati sottoposti ad infezione di prova con il ceppo IT/Ty/205-16/04, quelli dell'isolatore B con IT/Ty/Vr240/87 e i controlli inoculati con acqua sterile. Nei giorni successivi, sino al 12° giorno post-infezione (p.i.), in tutti i soggetti, è stata valutata la sintomatologia clinica. Dal 3° all'11° giorno p.i. sono stati eseguiti tamponi oro-faringei per valutare l'eliminazione virale mediante RT-PCR. Al 13° giorno p.i. tutti gli animali sono stati umanamente soppressi.

Misurazione della sintomatologia clinica.

La sintomatologia clinica è stata misurata seguendo il metodo descritto da Naylor e Jones (1994), assegnando un punteggio ad ogni animale secondo la seguente scala:

- 0 nessun sintomo;
- 1 scolo nasale limpido;
- 2 scolo nasale torbido;
- 3 rigonfiamento dei seni infraorbitali e/o essudato schiumoso oculare.

I soggetti che hanno mostrato punteggi ≥ 2 sono stati considerati affetti da sintomatologia grave.

RT-PCR per AMPV. L'estrazione dell'RNA e la RT-nested PCR sono state eseguite come descritto da Cavanagh *et al.* (1999). Ciascun tampone oro-faringeo è stato processato individualmente.

Risultati

Sei soggetti su 10 del gruppo vaccinato ed inoculato con AMPV del 2004 hanno mostrato sintomatologia clinica grave, contrariamente a quanto osservato nel gruppo vaccinato ed inoculato con AMPV del 1987, dove in nessun soggetto sono stati registrati punteggi ≥ 2 .

I risultati preliminari degli esami di RT-PCR per AMPV, riguardanti i campioni prelevati dai tacchini vaccinati, nei giorni 3 e 4 post-challenge, mostrano come abbia eliminato virus il 70% degli inoculati col AMPV del 2004 e solo il 30% di quelli inoculati con AMPV del 1987.

Come atteso, in tutti i tacchini non vaccinati e sottoposti a infezione di prova, sia con AMPV del 1987 che del 2004, è stata evidenziata sintomatologia grave ed eliminazione virale. Il gruppo C (controllo negativo) non ha mostrato nessun sintomo.

Discussione

I risultati di questo studio dimostrano come un ceppo di AMPV Italiano di recente isolamento abbia acquisito la capacità di eludere l'immunità indotta dalla vaccinazione. L'analisi della sequenza nucleotidica del gene G del ceppo IT/Ty/205-16/04 sottotipo B isolato in Italia nel 2004 ha mostrato numerose mutazioni rispetto al vaccino (Cecchinato *et al.*, 2007). La maggior parte di queste mutazioni coinvolgono amminoacidi che posseggono una carica (K, R, D, E and H) o che possono essere glicosilati durante il processo di modificazione post-traduzione (S e T), quindi potenzialmente in grado di determinare cambiamenti antigenici. Il ceppo vaccinale mostra invece un alto livello di omologia con i ceppi isolati in Italia e nel resto dell'Europa alla fine degli anni '80 (Cecchinato *et al.*, 2007), spiegando la maggiore resistenza dei soggetti vaccinati all'infezione di prova con il ceppo del 1987, osservata nel nostro studio.

E' probabile che AMPV sia evoluto in regioni antigeniche fondamentali e che ciò gli permetta la circolazione anche in gruppi correttamente vaccinati.

Bibliografia

- Catelli E. (2006). Dati epidemiologici sulle infezioni da Pneumovirus Aviare in Italia. Giornata di Studio INTERVET "Malattie respiratorie e problemi di produzione" 7 giugno 2006, Bologna, Italia. pp. 19-23.
- Catelli E., Cecchinato M., Savage C.E., Jones R.C., Naylor, C.J. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine*, 24, 6476-6482.
- Cavanagh D., Madwitt K., Britton P., Naylor, C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605.
- Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Sperati Ruffoni L., Pesente P., Piccirillo A., Franciosi C., Naylor, C.J. (2007). Sequence analysis of fusion (F) and attachment (G) protein genes of Avian *Metapneumovirus* strains isolated in Italy. In: *Proceedings of the 15th World Veterinary Poultry Congress*, Beijing, China. p. 187.
- Naylor C.J., Jones R.C. (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine*, 12, 1225-1230.
- Naylor C., Shaw K., Britton P., Cavanagh, D. (1997). Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathology*, 26, 327-338.
- Van de Zande S., Nauwynck H., Naylor C.J., Pensaert M. (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *Veterinary Record*, 147, 132-134.

UTILIZZO DI *REVERSE GENETICS* PER LA MESSA A PUNTO DI UN CONTROLLO POSITIVO PER LA RILEVAZIONE E DISTINZIONE, MEDIANTE RT NESTED PCR, DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A E B.

M. Falchieri¹, P. A. Brown¹, E. Catelli^{2*} and C. J Naylor¹.

¹ *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE, Neston, United Kingdom*

² *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

**Corresponding author* Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italy – Tel. +39 051 2097080- Fax: +39 051 2097039 – [Email elena.catelli@unibo.it](mailto:elena.catelli@unibo.it)

Un protocollo standard di RT Nested-PCR ad alta sensibilità viene comunemente usato nei nostri laboratori per evidenziare *Metapneumovirus* aviare (AMPV) e distinguere i sottotipi A e B (Cavanagh et al., 1999). Tale protocollo prevede, a seguito della fase di retrotrascrizione (RT), due PCR consecutive localizzate a livello del gene che codifica per la proteina di adesione (G). La prima amplificazione, cosiddetta esterna, utilizza *primer* (G1 + e G6 -) comuni a entrambi i sottotipi, mentre la seconda PCR, o interna, prevede un *primer* antisenso comune (G5 -) e due *primer* senso, uno specifico per il sottotipo A (G8+A) e l'altro specifico per il sottotipo B (G9+B). In caso di positività al sottotipo A l'amplificato è di 268 pb mentre al sottotipo B è di 361 pb. Fino ad oggi si è sempre evitato l'impiego di virus come controlli positivi per il rischio di possibili contaminazioni responsabili di falsi positivi.

Questo lavoro descrive l'utilizzo di metodiche di *Reverse Genetics* per la produzione di un virus geneticamente modificato in grado di generare nella RT Nested PCR standard precedentemente descritta, amplificati di dimensioni maggiori rispetto a quelli generati da virus non modificati. Tale virus, impiegato come controllo positivo, rende possibile evidenziare immediatamente eventuali contaminazioni.

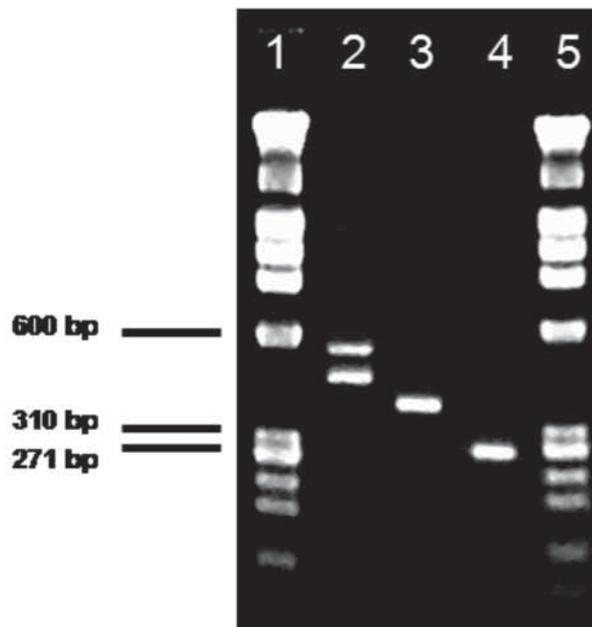
Una copia DNA del genoma di un AMPV sottotipo A è stata modificata tramite *Site Direct Mutagenesis* al fine di introdurre, a livello del gene G, la sequenza nucleotidica del primer specifico per il sottotipo B (G9+B), nella posizione equivalente. Per aumentare le dimensioni degli amplificati è stata successivamente introdotta una sequenza esogena fra i siti di attacco delle coppie di *primer* esterne ed interne della PCR. Il prodotto finale della PCR da DNA modificato ha prodotto amplificati di 463 e 556 pb, per il sottotipo A e B rispettivamente, di dimensioni maggiori rispetto a quelle che si ottengono da virus non modificati (figura 1). Mediante *Reverse Genetics* (Naylor et al., 2004), è stato quindi generato, da DNA modificato, un virus che dopo estrazione dell'RNA ed RT Nested PCR ha prodotto ugualmente gli amplificati attesi. Successivamente, per convenienza, il virus è stato adsorbito su carta filtro, fatto asciugare e inattivato tramite trattamento con microonde, quindi conservato in provette. L'RNA estratto da tali preparati è stato quindi usato efficacemente come controllo positivo.

Bibliografia

Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605.

Naylor C.J., Brown P.A, Edworthy N., Ling R., Jones R.C., Savage C.E., Easton A.J. (2004). Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of General Virology*, 85: 3219-3227.

Figura 1. Elettroforesi in gel di agarosio di amplificati da RT Nested PCR per AMPV sottotipo A e B. DNA Marker (linee 1 e 5); prodotto da controllo positivo AMPV geneticamente modificato (linea 2: amplificati di 556 e 463 pb); prodotti da virus non modificati: sottotipo B (linea 3: amplificato di 361 pb) e sottotipo A (linea 4: amplificato di 268 pb).



ASSOCIAZIONE FRA VACCINI VIVI ATTENUATI NELLA PROFILASSI DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE E DELL'INFEZIONE DA *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE NEL POLLO

Ganapathy K.¹, Catelli E.², Benedetti V.^{2*}, Lupini C.², Ricchizzi E.², Lemiere S.³, Montiel E.⁴, Jones R.C.¹

¹ *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE, Neston, United Kingdom.*

² *Università Bologna Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

³ *Meril SAS, 13b Avenue Albert Einstein, 69100 Villeurbanne, France*

⁴ *Meril Select, Inc. P.O. Drawer 2497, Gainesville GA 30503, USA*

**Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italia – Tel. +39 051 2097074 E-mail: valebene82@libero.it*

Introduzione

La Malattia di Newcastle (ND), sostenuta dai ceppi patogeni di *Paramyxovirus 1*, è ritenuta una delle più temibili forme infettive dei volatili per la sua gravità e trasmissibilità; in specie quali il pollo può causare mortalità fino al 100%. Assieme alle norme di profilassi diretta, la vaccinazione è punto cardine del controllo della malattia.

L'infezione da *Metapneumovirus aviare* (AMPV) causa la Rinotracheite infettiva del tacchino ed è fra le cause, assieme ad *Escherichia coli*, della Sindrome della testa gonfia nel pollo. Anche per la profilassi di quest'infezione, ampiamente diffusa nel nostro Paese, la vaccinazione è strumento imprescindibile che, anche nel pollo, sta assumendo grande rilevanza.

Poiché, per entrambi i virus, la vaccinazione viene consigliata nelle prime settimane di vita mediante vaccino vivo, di particolare interesse pratico risulterebbe poter associare questi interventi. In tale evenienza risultano necessarie informazioni sulla compatibilità fra i virus vaccinali. Infatti, quando si associano vaccini vivi diversi è fondamentale assicurarsi che non vi siano interferenze negative fra essi, tali da compromettere l'efficacia delle vaccinazioni o addirittura causare effetti patologici indesiderati.

L'obiettivo del presente lavoro è stato appunto quello di valutare l'interferenza fra ceppi vaccinali di NDV e AMPV somministrati in polli *Specific Pathogen Free* (SPF) singolarmente o in associazione. La ricerca è stata svolta mediante prove sperimentali condotte in condizioni di isolamento biologico e sono stati usati come indicatori la persistenza dei virus vaccinali nell'ospite, la risposta immunitaria e la protezione dalla forma clinica e dalla replicazione virale dopo infezione di prova.

Materiale e Metodi

Nella prova sono stati utilizzati vaccini vivi costituiti dai seguenti ceppi:

- per NDV: ceppo VG/GA e ceppo La Sota;
- per AMPV: ceppo PL21 sottotipo B.

Nella Tabella 1 è riportato il programma vaccinale a cui sono stati sottoposti i gruppi sperimentali.

Prima della somministrazione i vaccini sono stati accuratamente dissolti in acqua sterile. Per le vaccinazioni in associazione, dopo dissoluzione, i ceppi vaccinali venivano mescolati insieme, sempre in acqua sterile. A ciascun soggetto è stato somministrato un volume di 100 µl suddiviso in 2 parti uguali: 50 µl per via oculare e 50 µl per via orale, contenente virus vaccinale alle dosi per soggetto consigliata dalla casa produttrice.

Per valutare l'interferenza e l'innocuità dell'associazione fra i vaccini, gli animali sono stati monitorati, dopo gli interventi vaccinali, per eventuale comparsa di sintomatologia clinica ed i virus vaccinali sono stati re-isolati (NDV e AMPV) o evidenziati mediante RT nested-PCR (AMPV), da tamponi oro-faringei, a tempi stabiliti (0, 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 giorni di vita). L'isolamento di NDV è stato eseguito su uova embrionate di pollo SPF (Senne, 1998), mentre AMPV è stato isolato su colture di anelli tracheali di embrione di pollo (TOC) (Cook *et al.*, 1976). La RT nested-PCR per AMPV è stata eseguita secondo Cavanagh *et al.* (1999). Gli esami sierologici, eseguiti a 14, 21, 28, 35, 42 e 49 giorni di vita, sono stati effettuati mediante tecnica ELISA, per AMPV, e Inibizione dell'emoagglutinazione (HI), per la ricerca degli anticorpi anti-NDV.

A 42 giorni di vita, sei animali per gruppo sono stati movimentati e sottoposti ad infezione di prova con NDV (ceppo APMV-1/chicken/Italy/3015/00; ICPI 1,8) o AMPV sottotipo B. Dal 1° giorno post-infezione (p.i.) fino al termine della prova (50° giorno di vita), gli animali sono stati monitorati quotidianamente per comparsa di sintomi clinici riferibili ad AMPV o NDV. Ai giorni 5 e 8 p.i., da tutti i soggetti sottoposti ad infezione sperimentale con AMPV, sono stati raccolti tamponi oro-faringei per RT nested-PCR ed isolamento virale su TOC.

Le medie dei titoli anticorpali sono state paragonate utilizzando il test t di Student.

Risultati e Discussione

Nessun sintomo clinico è stato osservato negli animali sia in seguito alla prima vaccinazione che alla seconda, confermando la sicurezza dei vaccini testati anche se somministrati in associazione.

Il vaccino per ND, ceppo VG/GA, è stato eliminato dagli animali sino al 7° giorno post-vaccinazione, mai è stato eliminato il ceppo La Sota, anche quando somministrato in associazione col ceppo PL21.

Il ceppo PL21, per contro, è stato eliminato per un periodo più lungo (sino al 21° giorno post-vaccinazione) nel gruppo con vaccinazione simultanea con NDV, rispetto al gruppo vaccinato solo per AMPV. Questi risultati confermano quanto già riportato da Ganaphaty *et al.* (2005).

La risposta anticorpale nei riguardi del ceppo vaccinale PL21 per AMPV, sia dopo somministrazione singola sia in associazione con La sota, mostra un andamento simile e crescente con l'aumentare dell'età, che, nonostante un iniziale significativo ritardo nel gruppo 5, raggiunge titoli identici a 28 giorni post vaccinazione nei due gruppi. L'iniziale depressione immunitaria è probabilmente dovuta all'incapacità di AMPV di competere con NDV vaccinale, come già riportato anche da Ganaphaty *et al.* (2005).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata fra i titoli di anticorpi anti-NDV ottenuti sia dopo vaccinazione con VG/GA, che in seguito a richiamo

con La Sota, da solo o in associazione con PL21. In particolare, in seguito alla doppia vaccinazione non si è registrato alcun movimento nei livelli anticorpali, confermando i dati riportati da Ganapathy *et al.* (2006).

In seguito all'infezione di prova con AMPV, nessuna sintomatologia clinica specifica è stata osservata nei gruppi vaccinati (in singolo o in associazione con NDV), ed in nessuna occasione è stato re-isolato il virus. Un soggetto del gruppo vaccinato con solo PL21 è risultato tuttavia positivo alla RT nested-PCR per AMPV al 5° giorno p.i. Al contrario i soggetti di controllo non vaccinati hanno mostrato la sintomatologia attesa.

Stessa protezione completa si è osservata a seguito dell'infezione di prova con NDV in tutti i gruppi vaccinati (in singolo o in associazione con AMPV). Al contrario i soggetti non vaccinati hanno mostrato grave sintomatologia tipica dell'infezione da ND che ha avuto come esito il 100% di mortalità.

Conclusioni

L'esito della sperimentazione condotta permette di concludere che tutti i piani vaccinali testati per la profilassi della Malattia di Newcastle o dell'infezione da AMPV, sia con vaccinazione singola che in associazione, conferiscono un'eccellente protezione al challenge omologo. Resta da stabilire la durata di tale protezione.

La dimostrazione dell'efficacia di piani vaccinali che prevedano la contemporanea somministrazione di vaccini vivi attenuati per AMPV e NDV ha importanti risvolti economici nella gestione sanitaria dell'allevamento avicolo, in quanto la riduzione dei singoli interventi vaccinali determina un abbattimento dei costi ad essi correlati e limitazione dello stress provocato agli animali dagli interventi stessi. I risultati ottenuti forniscono quindi un contributo fondamentale all'ancora perfeffibile gestione dei piani vaccinali nell'allevamento del pollo con conseguente immediato risvolto applicativo.

Bibliografia

Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605

Cook J.K.A., Darbyshire J.H., Peter R.W. (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Archives of Virology*, 50, 109-118.

Ganapathy K., Cargill P., Montiel E. and Jones R.C. (2005). Interaction between live avian pneumovirus and Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens. *Avian Pathology*, 34, 297-302

Ganapathy K., Todd V., Cargill P., Montiel E., Jones R.C. (2006). Interaction between a live avian pneumovirus vaccine and two different Newcastle disease virus vaccines in broiler chickens with maternal antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathology*, 35, 429-434.

Senne D.A. (1998). Virus propagation in embryonating eggs. In: Swayne D.E., Wilson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M. (Eds) *A laboratory manual for the Isolation and identification of avian pathogens*. American Association of Avian Pathologists. Kennett Square, Pennsylvania. pp. 235-240.

MERIAL - Uno sguardo lungimirante...

Salmonella Enteritidis
&
Salmonella Typhimurium

chiedi consiglio al tuo Servizio Veterinario



...e le uova sono più sicure

Tabella 1: Programma vaccinale applicato ai singoli gruppi sperimentali

Gruppi sperimentali	N° animali	Età alla vaccinazione	
		0*	21*
Gp. 1 (controllo non vaccinato)	16	Acqua sterile	Acqua sterile
Gp. 2	16	NDV (VG/GA)§	Acqua sterile
Gp. 3	16	NDV (VG/GA)	AMPV (PL21)
Gp. 4	16	NDV (VG/GA)	NDV (La Sota)
Gp. 5	16	NDV (VG/GA)	(PL21 + La Sota)

*giorni di vita

§ ceppo vaccinale

SVILUPPO DI UN CLONE INFETTIVO DI *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE DELETO DEL GENE SH, CODIFICANTE LA PROTEINA GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)

Lupini C.^{1*}, Cecchinato M.², Naylor C.J.³, Catelli E.¹

¹ *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

² *Università di Padova, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

³ *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE Neston, United Kingdom*

**Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italia – Tel. +39 051 2097074 Email: caterina.lupini@unibo.it*

Introduzione

Metapneumovirus aviare (AMPV) è causa nel tacchino di una delle principali patologie di questa specie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT). Negli ultimi anni è stato messo a punto un sistema di *reverse genetics* per AMPV (Naylor *et al.*, 2004), che permette di introdurre mutazioni in punti specifiche del genoma, di ottenere cloni virali infettivi modificati e di valutarne le conseguenze fenotipiche (Naylor *et al.*, 2004). Questo sistema di *reverse genetics* è stato utilizzato per ottenere un virus ricombinante incapace di esprimere il gene SH che ha portato alla produzione su cellule Vero di un effetto citopatico anomalo caratterizzato da sincizi giganti (Naylor *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2008). La ragione di tale fenomeno potrebbe risiedere nel cambiamento nel pattern di trascrizione genomica dovuto alla perdita di un'unità trascrizionale. Allo scopo di approfondire tale ipotesi, in questo lavoro, il gene SH è stato sostituito con il gene che codifica per la Green Fluorescent Protein (GFP) che ha lunghezza simile e la cui espressione può essere facilmente evidenziata al microscopio ai raggi UV per via della fluorescenza del suo prodotto.

Materiali e metodi

Preparazione del costrutto plasmidico. Il plasmide contenente il genoma di AMPV delecto del gene SH (Δ SH-AMPV) è stato modificato utilizzando mutagenesi sito-specifica (Quikchange; Stratagene) in modo da inserire un sito di restrizione *SalI* immediatamente dopo il segnale di inizio di trascrizione del gene delecto. Siti di restrizione *XhoI* sono stati aggiunti ai due estremi del gene GFP mediante PCR in grado di copiare il gene del plasmide pEcoli-6xHN-GFPuv (Clonetech), utilizzando oligonucleotidi contenenti il sito di riconoscimento *XhoI*. La ligazione fra Δ SH-AMPV tagliato in *SalI* e GFP tagliato in *XhoI*, in presenza degli enzimi *SalI* e *XhoI*, ha portato al costrutto plasmidico finale del genoma di AMPV in cui il gene delecto SH è stato sostituito con il gene GFP (Δ SH-AMPV-GFP). Tale costrutto plasmidico è stato selezionato ed amplificato mediante: trasformazione di cellule competenti Stb12, successiva PCR di screening, sequenziamento, ulteriore coltura, purificazione del DNA e screening finale con enzimi di restrizione.

Clone infettivo. La trasfezione è stata eseguita su cellule Vero inoculate con virus Fowlpox ri-

combinante esprime la polimerasi T7. Le cellule sono state trasfettate, utilizzando Lipofetamina 2000, con il costrutto plasmatico Δ SH-AMPV-GFP dell'intero genoma virale ed altri plasmidi in grado di esprimere i geni N (nucleocapside), P (fosfoproteina), M2 (matrice 2^a) e L (polimerasi). Dopo incubazione per 12 ore a 37°C, il terreno di trasfezione è stato rimosso dal tappeto cellulare e sostituito con terreno di mantenimento. Come controllo è stata eseguita, con metodo analogo, anche la trasfezione di cellule Vero con il costrutto plasmidico iniziale deleto del gene SH (Δ SH-AMPV). Le colture cellulari venivano osservate quotidianamente per verificare la presenza di effetto citopatico e monitorate al microscopio a fluorescenza per evidenziare l'espressione di GFP. Sono stati eseguiti tre passaggi seriali.

Risultati

Fluorescenza verde, segno dell'espressione di GFP, è stata osservata nelle cellule trasfettate con il costrutto Δ SH-AMPV-GFP, due giorni dopo la trasfezione. Negative alla fluorescenza sono risultate le colture trasfettate con Δ SH-AMPV. L'effetto citopatico, in entrambi i casi, è iniziato con sparsi aggregate di cellule che poi confluivano in sincizi giganti. I sincizi indotti dai due virus erano indistinguibili. La fluorescenza è stata mantenuta fino al terzo passaggio mostrando che il gene GFP ha continuato ad essere stabilmente espresso. I virus ricombinanti hanno mostrato proprietà di crescita in coltura simili a quelle del ceppo d'origine selvaggio e l'inserzione di un gene estraneo non ha modificato sostanzialmente le caratteristiche di replicazione *in vitro* di Δ SH-AMPV.

Discussione

La simile dimensione della sequenza nucleotidica dei geni SH e GFP indica che l'alterazione dell'effetto citopatico causato dalla delezione del gene SH non è frutto della rimozione di un'unità trascrizionale e del conseguente effetto che ciò può avere sulla trascrizione e/o la traduzione a valle dei geni codificanti per le proteine di adesione e polimerasi. La proteina SH è quindi direttamente responsabile del mantenimento dell'effetto citopatico classico, comunemente osservato a seguito di infezione di cellule Vero con AMPV. Poiché è noto che il titolo virale ottenuto in colture Vero dopo infezione con virus deleto del gene SH sia circa 100 volte inferiore a quello ottenuto con il virus integro (Naylor *et al.*, 2004) si può ipotizzare che la proteina SH sia coinvolta in meccanismi sviluppati dal virus per aumentare l'efficacia della replicazione e quindi la quantità di virus eliminato dall'ospite.

Lo studio inoltre mostra che AMPV è in grado di accettare, esprimere e mantenere fino ad almeno tre passaggi su colture cellulari un gene estraneo. Virus ricombinanti di questo tipo, in grado cioè di esprimere geni eterologhi, possono trovare numerose applicazioni pratiche. Di particolare e promettente interesse l'espressione di proteine eterologhe immunogene di altri virus respiratori aviari, che ne aprirebbe l'utilizzo quale vaccino ricombinate sia per il tacchino che per il pollo. Inoltre per le sue proprietà fluorescenti, AMPV in grado di esprimere la proteina GFP può rivelarsi molto utile in studi di patogenesi.

Bibliografia

Ling R, Sinkovic S, Toquin D, Guionie O, Eterradossi N, Easton AJ (2008). Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame. *Journal of General Virology*, 89, 525-533.

Naylor C.J., Brown P.A., Edworthy N., Ling R., Jones R. C., Savage C. E., Easton A. J. (2004) Development of a reverse-genetics system for *Avian pneumovirus* demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of General Virology*, 85, 3219-3227.



FATRO

La salute animale per la salute dell'uomo

L'uomo ha bisogno degli animali per la compagnia e per la nutrizione, e questi animali devono essere sani: i primi perchè vivono in casa, i secondi perchè devono nutrire senza rischi.

Il mantenimento della salute degli animali è il nostro lavoro, delicato, meticoloso, svolto con apparecchiature scientifiche e macchinari perfetti, in locali ad aria variamente controllata, soprattutto per quanto riguarda l'eventuale necessità di sterilità dell'aria stessa: il tutto in un ambiente gradevole e distensivo.

Questi sono i nostri concetti, che ci fanno lavorare con entusiasmo e che cerchiamo di trasmettere ai tanti nostri Collaboratori nel mondo.

IL GRUPPO FATRO

stabilimenti di produzione in Italia

- **FATRO** - Ozzano Emilia - Bologna
- **FATRO-ATI/FOSCHI** - Ozzano Emilia - Bologna
- **FATRO-NEUVA** - Maclodio - Brescia

stabilimenti di produzione all'estero

- **FATRO-POLSKA** - Wroclaw (Polonia)
- **FATRO-VON FRANKEN** - Buenos Aires (Argentina)
- **BIOPHARM** *Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a.s.*
Praga (Repubblica Ceca)

altre filiali

- **FATRO-AVICO** - Atene (Grecia)
- **FATRO-IBÉRICA** - Barcellona (Spagna)
- **FATRO-FEDAGRO** - Montevideo (Uruguay)
- **FATRO-STALLEN** - Mumbai (India)
- **FATRO-INTERMED** - Agenzie nel mondo

info prodotti:
www.fatro.it

FATRO - industria farmaceutica veterinaria - 40064 Ozzano Emilia (BO)
Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512728 - www.fatro.it - e.mail: info@fatro.it



INFEZIONE DA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* IN POLLI DA RIPRODUZIONE CON TRASMISSIONE ALLA PROGENIE: EVOLUZIONE DELLA MALATTIA ED ASPETTI DIAGNOSTICI

Massi P., Tosi G.

IZSLER

Abstract: si descrive un episodio di infezione da *Mycoplasma gallisepticum* in polli da riproduzione e i riflessi di natura sanitaria sulla progenie. Considerazioni sugli strumenti diagnostici di laboratorio.

Nel febbraio 2008 venivano sottoposti ad indagine di laboratorio presso la Sezione di Forlì dell'IZSLER gli organi (teste con relative trachee) di polli da riproduzione Ross 708 di 40 settimane di vita con anamnesi di lieve forma respiratoria caratterizzata da lacrimazione, lieve essudato nasale in pochi soggetti senza un significativo calo di deposizione. La congiuntiva, l'essudato sinusale e la trachea venivano processati in PCR (metodica tradizionale-metodo interno IZSLER) per esclusione di Bronchite Infettiva (BI), Pneumovirus (mAPV) , *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) e *Mycoplasma synoviae* (Ms). Risultava positiva la PCR per Mg (Paganelli et al.,2002). Dopo 7 giorni il laboratorio analizzava 20 sieri del capannone 2 da cui provenivano i primi soggetti analizzati e dopo 30 giorni 30 sieri dei rimanenti capannoni (cap.1/3/4) di cui si compone l'azienda. Tutti i sieri del capannone 2 risultavano positivi in agglutinazione rapida condotta con l'Antigene Nobilis Intervet®, tutti positivi per Mg ed Ms in ELISA Proflok Symbiotics® con Densità Ottiche comprese fra 0.600 e 2.000 e positivi per Mg alla inibizione della emoagglutinazione (H.I.) metodo interno IZSLER con titoli compresi fra 1/80 e 1/640. I sieri dei restanti capannoni nell'arco di 30 giorni presentavano all'70% sieroconversione specifica per Mg in H.I..Il tentativo di isolamento effettuato sugli animali a distanza di un mese falliva e questo probabilmente dovuto al fatto che il gruppo era stato sottoposto a ripetuti trattamenti chemioantibiotici mirati.

Esattamente due mesi dopo (aprile 2008) venivano conferiti al laboratorio gruppi diversi di broilers allevati in province e regioni italiane diverse, riconducibili come provenienza allo stesso gruppo di riproduttori sopracitato. I soggetti, in età comprese fra i 12 e i 25 giorni, presentavano lacrimazione, congiuntivite, tracheite e aerosacculite catarrale. Tutti i gruppi risultavano positivi per Mg in PCR allestita da essudato tracheale e sieropositivi per Mg mediante tecnica ELISA. In alcuni casi erano contemporaneamente evidenziati il virus della Bronchite infettiva ed *Escherichia Coli*.

Contemporaneamente e successivamente venivano analizzati embrioni a termine e pulcini di 1 giorno di vita conferiti dall'incubatore e dagli allevatori per la ricerca di Mg tramite la sierologia e tramite PCR eseguita da trachea e sacco vitellino. Altri gruppi venivano controllati solo a fine ciclo in età di macellazione fino al mese di luglio.

Per concludere sono risultati positivi per Mg gli embrioni in schiusa per diverse settimane in 33 allevamenti di broilers collocati in 10 province distribuite in 7 Regioni diverse (vedi tabella).

Regioni	Province	N°episodi diagnosticati
Veneto	TV VC	2
Emilia Romagna	FC	3
Marche	AN MC AP	21
Umbria	PG	2
Lazio	VT	3
Molise	CB	1
Campania	BN	1
		Totale 33

Considerazioni

L'infezione da Mg ha coinvolto un allevamento di polli da riproduzione con lieve forma clinica e a lento andamento. Il gruppo di animali veniva più volte trattato con chemioantibiotici dedicati che probabilmente hanno contribuito a sottostimare l'importanza dell'infezione. Il gruppo ha continuato a schiudere per almeno altri 2 mesi dal momento della prima diagnosi di laboratorio, diffondendo per via verticale l'infezione che ha prodotto lesioni respiratorie più o meno evidenti in conseguenza delle diverse condizioni ambientali e di altri patogeni concomitanti come la Bronchite Infettiva e l'Escherichia Coli. Naturalmente ciò ha comportato costi aggiuntivi per accertamenti di laboratorio e trattamenti antibiotici.

Dall'altra parte i test di laboratorio attualmente in uso ed impiegati parallelamente si sono dimostrati sempre efficaci nel mettere in evidenza la presenza dell'infezione.

Sierologicamente la tecnica di laboratorio da preferirsi per sensibilità e precocità è risultata l'ELISA.

Dall'altra parte la PCR è una tecnica molto sensibile e specifica nello svelare la presenza del genoma batterico da tamponi tracheali in fase molto precoce anche rispetto alla sierologia. Inoltre è risultata una tecnica ben applicabile a partire dal liquido vitellino degli embrioni e pulcini mettendo in evidenza l'Mg parallelamente alla ricerca sierologica condotta sul siero e sul liquido vitellino.

In definitiva la tecnica PCR risulta essere uno strumento molto efficace nella diagnosi precoce di *Mycoplasma gallisepticum* e si consiglia di utilizzarla in tutti i gruppi di animali che vanno sistematicamente monitorati nei confronti del micoplasma.

La PCR rappresenta una alternativa rapida e sensibile al metodo colturale tradizionale con richiesta di terreni specifici e reagenti che richiedono tempo e costi maggiori (Levisohn, 2000). I risultati della PCR si ottengono in 24-48 ore al contrario delle 2-3 settimane per l'isolamento e identificazione del Micoplasma. Di notevole importanza inoltre è la capacità in PCR di ottenere risultati accurati anche in presenza di infezioni miste da Micoplasmi, contaminazioni varie secondarie da altri batteri, inibizioni da antibiotici o di risposte anticorpali specifiche.

Bibliografia

1) Levisohn S., Kleven S.H. (2000). "Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). Rev. Sci. Tech. Int. Epiz., 2000, 19 (2), 425-442.

2) Paganelli F., Massi P., Tosi G. (2002) "Applicazione del metodo Polymerase chain reaction alla diagnosi di *Mycoplasma gallisepticum* e di *Mycoplasma synoviae*". Large Animal Review, 8, n.6, dicembre 2002.

PROVA DI INFEZIONE SPERIMENTALE CON UN CEPPLO DI SALMONELLA HADAR, ISOLATO DAL CAMPO, IN POLLI SPF E CONTROLLO DELLA REPLICAZIONE ED ESCREZIONE BATTERICA MEDIANTE L'UTILIZZO DI UN PRODOTTO A BASE DI ACIDI ORGANICI ED AROMI NATURAL-IDENTICI MICROINCAPSULATI (BREV. EUROPEO N. 1391155 B1) MISCELATO NELL'ALIMENTO IN CONCENTRAZIONI DIVERSE.

Massi P.¹, Tosi G.¹, Vandì L.², Piva A.²

¹. IZSLER-Sezione di Forlì

². VETAGRO s.r.l.

Abstract

Si descrivono i risultati di una prova infezione sperimentale con un ceppo di *Salmonella hadar*, isolato dal campo, in polli SPF, ed il controllo della replicazione ed escrezione batterica in seguito all'utilizzo di un prodotto, a base di acidi organici ed aromi natural-identici microincapsulati, miscelato nell'alimento in concentrazioni diverse di 0,3-1.0-5,0 Kg/tonn di mangime. Per una maggior valutazione della prova sono stati raccolti anche i parametri zootecnici.

Protocollo operativo

Si utilizzavano 125 pulcini SPF SPAFAS® di 1 giorno di età di razza leggera, suddivisi in 5 gruppi in maniera random e ogni gruppo costituito di 25 soggetti veniva immesso in isolatore presso lo stabulario della Sezione diagnostica di Forlì dell'IZSLER.

Il ceppo di *Salmonella hadar* prot.FO/313086/2008 veniva isolato dal fondo delle scatole di trasporto di pollastre di 1 giorno.

La miscela degli acidi organici e di aromi naturali era integrata in un mangime per polli da carne in tre diverse concentrazioni da parte dell'azienda fornitrice della stessa miscela (Piva et al.2007).

I gruppi erano così rappresentati:

n.1 : gruppo di controllo negativo non infettato e alimentato con mangime per polli non trattato.

n.2: gruppo di controllo positivo infettato per *Salmonella hadar* con 30-6 ufc/ml/capo per via endoesofagea ad un mese di vita. Il gruppo veniva alimentato con mangime per polli non trattato.

n.3 : il gruppo veniva infettato con *Salmonella* come il controllo positivo. Questo gruppo era alimentato con mangime per polli contenente la miscela di acidi organici e aromi naturali nella misura di 0,3Kg/tonn di mangime dal primo giorno di vita.

n.4: il gruppo veniva infettato con *Salmonella* come il controllo positivo. Questo gruppo era alimentato con mangime per polli contenente la miscela nella misura di 1,0 Kg/tonn di mangime.

n.5: il gruppo veniva infettato con *Salmonella* come il controllo positivo. Questo gruppo era alimentato con mangime per polli contenente la miscela nella misura di 5,0 Kg/tonn di mangime.

Tutti i gruppi in fase post infezione venivano controllati per l'andamento clinico (depressione del gruppo, diarrea, eventuale mortalità) e monitorati dopo 2 giorni attraverso tamponi cloacali per il controllo dell'attecchimento dell'infezione; dopo 5 giorni

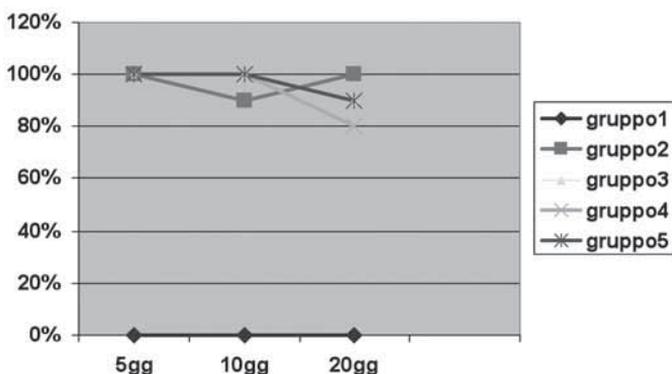
dall'infezione (sopprimendo 5 soggetti per gruppo), dopo 10 giorni (sopprimendo 10 soggetti per gruppo) e dopo 20 giorni (sopprimendo i restanti 10 soggetti per gruppo) al fine di valutare la presenza quali e quantitativa della salmonella nei ciechi e nell'ultimo prelievo anche nel fegato e milza. Inoltre sono stati valutati i parametri zootecnici come il consumo di acqua e mangime e gli indici di accrescimento.

Nel prelievo finale i soggetti sono anche stati saggiati da un punto di vista sierologico al fine di evidenziare eventuali positività crociate nei confronti di *Salmonella enteritidis*, *typhimurium* e *pullorum-gallinarum*.

Risultati

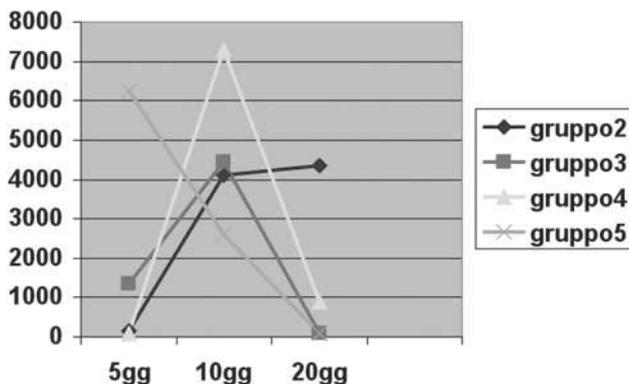
I grafici 1 e 2 sono riassuntivi delle medie delle percentuali di positività e del conteggio della Salmonella nei ciechi dei soggetti a 5,10 e 20 giorni post-infezione

Grafico1. riassuntivo della percentuale di positività della Salmonella nei ciechi nei 5 gruppi nei tre prelievi post-infezione (5,10 e 20 giorni post-infezione)



Come si può vedere l'unico gruppo in cui dopo 20 giorni permane la positività nel 100% dei soggetti è il gruppo infettato e non trattato.

Grafico2. riassuntivo della media dei conteggi Salmonella dai ciechi, espressi in ufc/gr. dei 4 gruppi infettati nei tre prelievi post infezione (5,10 e 20 giorni post infezione)



Il gruppo 2 non trattato è l'unico che non ha avuto una riduzione del numero di Salmonelle.

Nell'ultimo prelievo la Salmonella è stata reisolata anche nei fegati e nella milza in tutti i gruppi infettati nella percentuale del 30-40 % dei soggetti esaminati senza differenze significative fra i quattro gruppi e sempre in numero molto basso al di sotto delle 100 ufc/gr.

In **Tabella 1** sono riassunti i pesi medi del prelievo finale

	Gruppo n.1	Gruppo n.2	Gruppo n.3	Gruppo n.4	Gruppo n.5
Pesi medi in gr.	649,00	628,50	664,50	657,00	675,00

In **tabella 2** sono riassunti i consumi di acqua

	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Gruppo 5
Consumo totale di acqua	30,5 lt	32 lt	33,5 lt	31,5 lt	35 lt

In **tabella 3** sono riassunti i consumi di mangime

	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Gruppo 5
Consumo totale di mangime	12,300kg	13,850kg	13,900kg	13,500kg	13,700kg

Per quanto attiene alla sierologia, nessun soggetto, a fine prova, ha presentato risposta anticorpale crociata verso gli Antigeni per *Salmonella enteritidis*, *typhimurium* e *pullorum-gallinarum*.

Considerazioni

La prova sperimentale eseguita ci conduce ad una serie di considerazioni preliminari che dovranno essere riconfermate con prove successive.

L'obiettivo della prova sperimentale era quella di verificare la riduzione di prevalenza e di replicazione di soggetti infettati con Salmonella e trattati con sostanze naturali come prevede la normativa vigente sulle Salmonelle (Reg.2160/2003) che vieta l'utilizzo di trattamenti antibiotici in caso di gruppo infetto da Salmonella.

La prima considerazione riguarda il permanere della presenza di Salmonella nei ciechi della gran parte dei soggetti 3 settimane dopo l'infezione. La seconda considerazione riguarda la significativa riduzione, nei gruppi alimentati con mangime trattato, del numero di Salmonelle, fra il primo prelievo e l'ultimo, e fra il gruppo di controllo positivo e i gruppi trattati nell'ultimo controllo, alla luce anche della massiva infezione indotta. Sempre nell'ultimo controllo i pesi medi dei gruppi trat-

tati sono significativamente più alti rispetto al controllo positivo ed anche maggiori rispetto al controllo negativo. Per quanto attiene al consumo di acqua e mangime: tutti i gruppi infettati hanno bevuto e consumato una maggior quantità di acqua e alimento.

Un ultimo spunto di discussione riguarda il fatto che tutti i soggetti infettati non hanno manifestato alcun sintomo clinico, nonostante che la *Salmonella hadar* è stata dimostrata replicare bene e diffondersi in modo sistemico anche nel fegato e nella milza. Ciò dimostra la pericolosità della *Salmonella hadar*, che non essendo patogena per la specie, replica nel pollame in modo silente e solo il costante monitoraggio di tipo batteriologico può metterla in evidenza.

Bibliografia

Piva et al.,2007.”Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine”*J.Anim.Sci.*2007.85:486-493

FOCOLAIO DI RINOTRACHEITE INFETTIVA DEL TACCHINO (TRT), DA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* DI ORIGINE VACCINALE, IN TACCHINI DI 7 SETTIMANE.

Ricchizzi E.^{1*}, Lupini C.¹, Cecchinato M.², Brown P.³, Naylor C.J.³, Catelli E.¹

¹ *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

² *Università di Padova, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

³ *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE, Neston, United Kingdom*

**Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italy – Tel. +39 051 2097074- Fax: +39 051 2097039 – Email enrico.ricchizzi2@unibo.it*

Introduzione

Il *Metapneumovirus Aviare* (AMPV) è un virus a RNA appartenente alla famiglia Paramyxoviridae, genere *Metapneumovirus*, in grado di determinare infezioni delle prime vie respiratorie nel tacchino e nel pollo. Il confronto delle sequenze nucleotidiche ha permesso di distinguere 4 sottotipi virali (A, B, C e D) (Cook, 2000). Indagini epidemiologiche di campo svolte in Italia hanno evidenziato una netta prevalenza del sottotipo B sin dalla prima comparsa dell'infezioni nel 1987. Per il controllo di AMPV, nel nostro Paese, a partire dagli anni '90, è stata introdotta la vaccinazione; eseguita prevalentemente col sottotipo B ed in misura minore col sottotipo A, sebbene, sino al 2003, non ci fossero evidenze della presenza di AMPV/A in Italia (Catelli *et al.*, 2004).

I vaccini vivi attenuati conferiscono una buona protezione ma la loro instabilità può portarli a riacquisire virulenza anche dopo un limitato numero di retropassaggi. Sperimentalmente è stato dimostrato che sono sufficienti 4-10 retropassaggi su animali sensibili (Naylor *et al.* 1994). Uno studio successivo ha dimostrato come ciò può avvenire anche in allevamento. Animali vaccinati al primo giorno di vita in incubatoio con un sottotipo A hanno mostrato, dopo 3 settimane, una forma respiratoria durante la quale è stato isolato un AMPV sottotipo A. Il sequenziamento dell'intero genoma virale e l'identificazione di 9 nucleotidi *marker* vaccinali ne ha dimostrato l'inequivocabile origine vaccinale (Catelli *et al.*, 2006).

In questo lavoro viene riportato un focolaio di TRT verificatosi in Italia nel 2003, dovuto ad AMPV sottotipo A di origine vaccinale che ha interessato tacchini di 7 settimane vaccinati con un sottotipo B.

Materiali e metodi

Allevamento. Il focolaio di TRT riportato in questo studio si è verificato in un allevamento di tacchini da carne. Tutti gli animali erano stati vaccinati a 7 giorni di vita per via oculo-nasale con un vaccino vivo attenuato del sottotipo B. In allevamento erano presenti 4 gruppi, di 4000-5000 maschi ciascuno. Essi hanno mostrato i primi sintomi respiratori, caratterizzati da starnuti, scolo nasale ed oculare, e difficoltà respiratoria, a circa 45 giorni di

età. La forma respiratoria, che è stata complicata da infezioni secondarie, ha gradualmente interessato tutti i gruppi causando una mortalità totale del 10-11%.

Campionamento. Il campionamento è stato eseguito in 2 gruppi, da 10 soggetti per gruppo, che mostravano i primi sintomi respiratori. Da ogni animale sono stati eseguiti due tamponi rinofaringei, uno per isolamento virale e l'altro per RT nested-PCR. I tamponi per RT nested-PCR sono stati lasciati asciugare all'aria per 30 minuti quindi conservati a temperatura ambiente sino alla processazione. Quelli destinati all'isolamento virale sono stati immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti a temperatura di ghiaccio fondente sino al momento della preparazione dell'inoculo. I tamponi sono stati processati in pool di 10.

RT nested-PCR. Per evidenziare e tipizzare AMPV dai tamponi a secco e confermare l'isolamento virale, è stata impiegata una RT nested-PCR sottotipo A e B specifica (Cavanagh *et al.*, 1999).

Isolamento virale. L'isolamento di AMPV è stato eseguito su colture di anelli tracheali di embrioni di pollo (Catelli *et al.*, 1998). Le colture erano ritenute positive se si osservava ciliostasi entro 10 giorni dall'inoculazione. La conferma dell'isolamento e la tipizzazione del ceppo è stata eseguita mediante RT nested-PCR.

Caratterizzazione molecolare del ceppo di AMPV. Il genoma del virus isolato è stato amplificato nelle regioni contenenti i 9 marker vaccinali identificati da Catelli *et al.* (2006), secondo la metodica ivi descritta.

Valutazione della patogenicità del ceppo di AMPV

Allo scopo di valutare la patogenicità del ceppo AMPV isolato durante questo studio e denominato 259-01/03, è stata condotta un'infezione sperimentale in condizioni d'isolamento biologico. Trenta tacchini di un giorno di vita, non vaccinati per AMPV e provenienti da un incubatoio che applica misure di biosicurezza elevate, sono stati divisi in gruppi di dieci e alloggiati in tre isolatori per pollame. Un gruppo è stato inoculato con 3,5 Log₁₀ ID₅₀ per animale, del ceppo 259-01/03. Un altro è stato inoculato con il vaccino sottotipo A caratterizzato da Catelli *et al.* (2006) ad una dose per soggetto 10 volte superiore a quella consigliata dalla casa produttrice; l'ultimo è stato inoculato con acqua sterile e tenuto come controllo negativo. In tutti i gruppi, giornalmente, dal 1° al 14° giorno post infezione, è stata valutata la sintomatologia clinica assegnando un punteggio, per ogni animale, secondo la seguente scala: 0 = assenza di sintomi; 1 = scolo nasale limpido; 2 = scolo nasale torbido; 3 = rigonfiamento dei seni infra-orbitali o essudato schiumoso oculare.

Risultati

Da un gruppo di tacchini con sintomatologia clinica di TRT è stato isolato su TOC, ed identificato mediante RT nested-PCR, un ceppo AMPV sottotipo A, denominato 259-01/03, che all'infezione sperimentale si è mostrato patogeno (figura 1). La sequenza nucleotidica di questo ceppo, in otto delle nove posizioni *marker* vaccinali identificate da Catelli *et al.* (2006) (tabella 1), risultava identico al vaccino, mentre in posizione 3.553, posizione *marker* mancante, era uguale al ceppo genitore.

Discussione

Confermando un precedente lavoro (Catelli *et al.*, 2006) è stato in questo studio isolato un AMPV sottotipo A di origine vaccinale in grado di causare in campo sintomatologia respiratoria caratteristica della TRT e patogeno all'infezione sperimentale. Tuttavia in quest'occasione il virus è stato isolato in un allevamento nel quale non era stata effettuata vaccinazione con AMPV del sottotipo omologo. Esso quindi, verosimilmente, è stato introdotto dall'ambiente esterno o, ipotesi meno probabile, ha persistito nell'ambiente da una precedente vaccinazione con sottotipo A.

La presenza di otto *marker* vaccinali su nove dimostra incontrovertibilmente che il ceppo isolato è di origine vaccinale, e l'infezione sperimentale ne conferma la patogenicità. La mutazione in posizione nucleotidica 3.553 potrebbe essere legata al processo di riacquisizione di patogenicità e richiede ulteriori approfondimenti. Poiché il gruppo era stato vaccinato con AMPV sottotipo B, un'altra conferma emerge dallo studio, relativa al fatto che la cross-protezione fra sottotipi è limitata (Van de Zande *et al.*, 2000).

Bibliografia

Catelli E., Cook J.K.A., Chester J., Orbell S.J., Woods M.A., Baxendale W., Huggins M.B. (1998) The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian Pneumovirus in chickens. *Avian Pathology*, 27, 632-640.

Catelli E., Cecchinato M., Ortali G., De Matteo P., Savage C.E., Jones R.C., Naylor C.J (2004). *Avian Pneumovirus in Italy*. Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Corona and Pneumovirus Infections, Rauischholzhausen, Germany, 20-24 June 2004. WB Lauferweiler Verlag, Wettemberg, Germany, 2004, pp. 275-281.

Catelli E, Cecchinato M, Savage CE, Jones RC, Naylor CJ (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine*, 24, 6476-6482.

Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor CJ (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605.

Cook J.K.A. (2000). Avian Pneumovirus infections of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal*, 160, 118-125.

Naylor CJ, Jones RC (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine*, 12(13), 1225-30.

Van de Zande S, Nauwynck H, Naylor CJ, Pensaert M (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *The Veterinary Records*, 147, 132-4

Tabella 1: *Marker* vaccinali: nucleotidi e posizione genomica.

Posizione§ Genomica	Ceppo* progenitore	Ceppo* Vaccinale	Ceppo 259-01/03
2.941	U	A	A
3.553	U	C	U
3.825	G	A	A
5.055	A	G	G
5.140	U	C	C
5.929	A	G	G
6.358	U	C	C
10.022	U	G	G
11.624	U	C	C

§ in senso antigenomico

* da Catelli *et al.*, 2006

INDAGINI DI CAMPO SULL'INFEZIONE DA *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE NELL'ALLEVAMENTO DELLA GALLINA OVAIOLA

Ricchizzi E.^{1*}, Falchieri M.², Lupini C.¹, Cecchinato M.³, Meini A.⁴, Bianchi E.⁵, Catelli E.¹

¹ *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

² *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE Neston, United Kingdom*

³ *Università di Padova, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

⁴ *Intervet Shering Plough Animal Health, Segrate (MI) Italy*

⁵ *Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi, S. Martino B.A. (Verona), Italy;*

**Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italy – Tel. +39 051 2097074- Fax: +39 051 2097039 – Email enrico.ricchizzi2@unibo.it*

Introduzione

Il *Metapneumovirus* aviare (AMPV) è l'agente eziologico della Rinotracheite del Tacchino ed è responsabile nel pollo, oltre che d'infezioni respiratorie, di cali dell'ovodeposizione nei riproduttori e nelle ovaiole per la produzione di uova da consumo (Cook *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2006). In Italia l'infezione è endemica nelle regioni a maggior vocazione avicola quali Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna (Catelli *et al.*, 2004). Se il quadro epidemiologico della diffusione di AMPV nell'allevamento del tacchino e del pollo da carne in Italia è piuttosto chiaro, e ben conosciute sono le problematiche sanitarie correlate ad esso (Catelli, 2006), scarse e frammentarie risultano le informazioni relative all'impatto che tale infezione ha sul settore della produzione di uova da consumo.

Allo scopo di delineare un quadro della situazione di campo il più possibile aderente alla realtà, e sulla base di questo sviluppare adeguati piani profilattici, è stata svolta sul territorio nazionale, in particolare nelle aree a rischio d'infezione, un'indagine sulla diffusione di AMPV nell'allevamento della gallina ovaiole. Il progetto ha previsto studi longitudinali e campionamenti singoli in allevamenti sia in fase pollastra che ovaiole, per la ricerca di AMPV diretta, mediante RT-PCR, ed indiretta mediante test ELISA. Dove possibile i risultati sono stati integrati con i dati produttivi dell'allevamento, gli eventuali piani vaccinali applicati e cali dell'ovo deposizione.

Materiali e Metodi

Allevamenti/Gruppi. Lo studio è stato svolto in allevamenti di pollastre ed ovaiole per la produzione di uova da consumo (tabella 1) situati in Lombardia, Vene-



Prodotti per la salute animale

to ed Emilia-Romagna, nel periodo compreso fra ottobre 2006 e dicembre 2007. All'interno di ogni allevamento sono stati oggetto d'indagine uno o più gruppi di animali. Per ogni gruppo veniva compilata una scheda di allevamento/gruppo. In essa venivano riportati, oltre ai dati identificativi dell'allevamento, il numero di soggetti, l'età, le vaccinazioni eseguite per AMPV, l'eventuale sintomatologia clinica pregressa o in atto (forme respiratorie e/o calo dell'ovodeposizione).

Campionamento. Dagli animali di ciascun gruppo sono stati raccolti tamponi rino-faringei per RT nested PCR e/o campioni di sangue per esami sierologici mediante ELISA, in numero di 10 per tipo. I primi venivano processati in pool. Nello studio longitudinale n.1, i campionamenti sono stati eseguiti 2 volte alla settimana, dall'età di 20 sino a 42 settimane. Nello studio longitudinale n.2, in fase pollastra, sono stati eseguiti campionamenti pre-vaccinazione (11 settimane) e post- vaccinazione (14 settimane), successivamente, all'inizio della deposizione è stato eseguito un altro campionamento a 20 settimane, ed un quarto, solo nel gruppo 4, a 24 settimane. Il resto dei gruppi considerati sono stati campionati una volta sola.

RT nested PCR per AMPV. Per evidenziare e tipizzare AMPV dai tamponi a secco è stata impiegata una R-nested-PCR disegnata sulla sequenza del gene che codifica la proteina virale di adesione (G). Tale protocollo permette, in base alla dimensione dei prodotti di amplificazione, di identificare e discriminare i sottotipi A e B (Cavanagh *et al.*, 1999).

ELISA per AMPV. Nell'indagine sierologica è stato utilizzato il kit ELISA del commercio IDEXX FlockChek Avian Pneumovirus Antibody (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine) in grado di evidenziare anticorpi per AMPV sottotipi A, B e C.

Risultati e Discussioni

I risultati, riportati in tabella n.1, dimostrano un'elevata diffusione dell'infezione da *Metapneumovirus* aviare negli allevamenti campionati. Tutti i ceppi evidenziati appartenevano al sottotipo B. e ciò concorda con i dati a oggi disponibili sulla situazione epidemiologica nazionale indicanti la prevalenza netta di questo sottotipo (Catelli, 2006) rispetto al sottotipo A, pur presente in Italia (Cecchinato *et al.*, 2003). In sole due evenienze è stato possibile correlare la presenza dell'infezione da AMPV a cali dell'ovodeposizione. Degni di nota sono i risultati ottenuti dallo studio longitudinale n°1, da cui è stato possibile delineare alcune considerazioni sull'efficacia di alcuni piani vaccinali nel prevenire l'infezione virale, concludendo che solo il piano vaccinale che prevedeva tre interventi, fra cui uno con vaccino inattivato, sembra avere protetto completamente dall'infezione. Nello studio longitudinale n°2, pollastre negative sierologicamente, vaccinate con vaccino vivo attenuato, hanno successivamente tutte mostrato l'infezione da AMPV entro la 20a settimana di vita, in coincidenza con l'evento stressante dell'accasamento e della entrata in deposizione. La vaccinazione singola con vaccino vivo si è in questo caso confermata inefficace a proteggere oltre che dall'infezione anche dal calo dell'ovodeposizione (Cook *et al.*, 2000) che è stato osservato nel gruppo n. 4 a 22

settimane di età. I campionamenti singoli hanno evidenziato come molti gruppi si infettino in fase pollastra, senza sintomi clinici evidenti, arrivando sieropositivi alla deposizione. Interessante sarà indagare se il contatto con il virus in tale fase protegga da ulteriori infezioni nella futura vita produttiva. Questo studio fornisce dati preliminari ma unici disponibili in Italia sulla diffusione e dinamica delle infezioni da AMPV nel settore produttivo dell'uovo da consumo.

Bibliografia

Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Matteo P., Ortali G., Franciosi C., De Marco M.A., Naylor C.J. (2004). Avian Pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: a virological, molecular and serological field survey. *Italian Journal of Animal Science*, 3(3), 286-292.

Catelli E. (2006). Dati epidemiologici sulle infezioni da Pneumovirus Aviare in Italia. Giornata di Studio INTERVET "Malattie respiratorie e problemi di produzione" 7 giugno 2006, Bologna, Italia. pp. 19-23.

Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605.

Cecchinato M., Catelli E., Savane C.E., De Matteo P., Faenzi M., Naylor C.J., (2003). Evidenza di pneumovirus aviare sottotipo A in corso di un focolaio di TRT in tacchini da carne in Italia. XLII Convegno Società Italiana Patologia Aviare, Forlì 2-3 ottobre 2003. *Large Animals Review*, 9 (6), 121-122.

Cook J.K.A., Chesher J., Orthel F., Woods M.A., Orbell S.J., Baxendale W., Huggins M.B., (2000). Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies. *Avian Pathology*, 29, 545-556.

Hess M., Huggins MB, Mudzamiri R, Heincz U. (2004). Avian metapneumovirus excretion in vaccinated and non-vaccinated specified pathogen free laying chickens. *Avian Pathology*, 33(1), 35-40.

Sugiyama M., Koimaru H., Shiba M., Ono E., Nagata T., Ito T. (2006). Drop Egg production in chickens by experimental infection with avian metapneumovirus strain PLE8T1 derived from swollen head syndrome and the application to evaluate vaccine. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(8), 783-787.

Tabella 1: Allevamenti campionati e risultati degli esami di RT nested PCR ed ELISA

	Gruppo	VACCINAZIONE	CAMPIONAMENTO	Risultati	
				ELISA	RT-PCR
STUDIO LONGITUDINALE 1 (ovaiole)	1	Vivo spray (9)* Spento (15) Vivo in acqua da bere (19)	RT-PCR 2 volte a settimana (da 20 a 42)*	n.r.	+B (20)*
	2	Vivo spray (9) Vivo in acqua da bere(19)			+B (20 e 32)
	3	Vivo in acqua da bere (19)			+B (25 e 26)
STUDIO LONGITUDINALE 2 (pollastre-ovaiole)	4	Vivo spray (11)	ELISA (11, 14, 20, 24§) RT-PCR (20, 24§)	- (11) + (14, 20, 24)	+B (20 e 24)
	5				+B
	6				-
CAMPIONAMENTI SINGOLI (pollastre)	7	n.e.	RT-PCR, ELISA (16)	+	-
	8	n.e.	RT-PCR, ELISA (16)	+	-
	9	n.e.	RT-PCR, ELISA (14)	+	+B
	10	Vivo in acqua da bere (9)	RT-PCR(16)	n.e.	-
CAMPIONAMENTI SINGOLI (ovaiole)	11	Vivo spray (15)	ELISA, RT-PCR (34)	+	-
	12	n.e.	ELISA (18), RT-PCR (17)	+	-
	13	n.e.	ELISA (23), RT-PCR (23)	+	-
	14	n.e.	ELISA (23), RT-PCR (23)	+	-

()* = età in settimane di vita, n.r. = non riportata, n.e. = non eseguita, + = positivo, B = AMPV sottotipo B
- = negativo, § = solo gruppo 4

OTTIMIZZAZIONE DI UN METODO PCR PER LA RICERCA DI *SALMONELLA* SPP. DA MANGIMI

Taddei R., Tosi G., Massi P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione di Forlì*

Key words: *Salmonella* spp., PCR, mangime

Abstract

Salmonella spp. rappresenta una delle maggiori cause di tossinfezioni trasmesse da alimenti. Poichè le tecniche colturali convenzionali richiedono lunghi tempi di risposta, negli ultimi anni sono stati sviluppati alcuni metodi PCR notevolmente più rapidi. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di ottimizzare un metodo PCR tradizionale per la ricerca di *Salmonella* spp. da mangimi ad uso zootecnico. Tre diversi metodi di estrazione sono stati accoppiati ad un protocollo di amplificazione e testati su mangimi artificialmente contaminati. Utilizzando questo metodo è stato possibile rilevare la presenza di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. per 50 grammi di mangime. Gli stessi metodi saranno anche testati su mangimi naturalmente contaminati e su campioni di contenuto cecale di polli SPF sperimentalmente infettati con un ceppo di campo di *S. enterica* serotype Hadar.

Introduzione

Salmonella spp. è riconosciuta come uno dei maggiori agenti zoonotici per gli uomini e gli animali. In un recente parere dell'EFSA sulla valutazione del rischio microbiologico dei mangimi per animali destinati alla produzione alimentare, sia per la salute umana che per la salute animale (3), il gruppo di esperti scientifici ha individuato in *Salmonella* spp. il principale pericolo di contaminazione microbica dei mangimi. I mangimi contaminati da *Salmonella* spp. costituiscono una fonte di potenziale infezione per gli animali destinati alla produzione alimentare e di contaminazione degli alimenti derivati. Allo scopo di minimizzare il rischio di infezione, diventa fondamentale l'adozione di misure di controllo lungo tutta la catena produttiva alimentare. In questo contesto, la PCR rappresenta un metodo con indubbi vantaggi rispetto al metodo colturale, legati in particolare ai tempi di risposta considerevolmente minori (2 giorni rispetto ai 4-6 giorni della coltura).

Scopo del lavoro

Scopo del lavoro è la ottimizzazione di un metodo PCR attraverso il confronto tra tre diversi protocolli per la ricerca di *Salmonella* spp. da campioni di mangime. Campioni di mangime sono stati artificialmente contaminati con una sospensione a titolo noto di *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 6994 ed analizzati con i tre protocolli PCR, con il metodo colturale di riferimento ISO 6579(2002)/Cor1 (2004) "Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp." e con il metodo ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D: "Detection of *Salmonella* spp. In animal faeces and environmental samples from the primary production stage (2007)". La metodica PCR ottimizzata verrà quindi applicata a campioni di mangime naturalmente

infetti e a campioni di contenuto cecale provenienti da polli SPF infettati sperimentalmente con un ceppo di campo di *S. enterica* serotype Hadar.

Materiali e Metodi

Estrazione

Crescita del ceppo batterico utilizzato per l'inoculo. Il ceppo di *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 6994 utilizzato per la contaminazione dei campioni di mangime è stato coltivato in Acqua Peptonata Tamponata.

Quantificazione batterica attraverso conta vitale. La concentrazione della sospensione batterica è stata determinata piastrando diluizioni seriali in base 10 su terreno Hektoen.

Preparazione di campioni di mangime artificialmente contaminato. Il mangime utilizzato per l'analisi, preventivamente testato con esito negativo per la presenza di *Salmonella* spp. con metodo colturale di riferimento ISO 6579(2002)/Cor1 (2004), è un mangime completo per galline in produzione reperito sul commercio. Diluizioni seriali in base 10, da 10^5 a 10^{-2} *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 6994 per ml, sono state allestite in soluzione di Ringer. 50 grammi di ogni campione di mangime sono stati omogenati in 450 ml di Acqua Peptonata Tamponata in un sacchetto da stomacher ed addizionati di un'aliquota di sospensione batterica in modo da ottenere campioni con concentrazione finale da 4×10^5 a 0,04 c.f.u di *Salmonella* in 50 g di mangime. I sacchetti sono stati incubati a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18 ± 2 ore e sottoposti ad analisi mediante i 2 metodi microbiologici, ISO 6579(2002)/Cor1 (2004), ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D (2007).

Estrazione di DNA dai campioni di mangime dopo prearricchimento. I campioni di mangime sono stati sottoposti a 3 diversi metodi di estrazione. Ogni metodo è stato testato su due repliche (A e B) di campioni contaminati:

- Metodo 1: kit DNeasy® Blood & Tissue, Qiagen

1 ml del brodo di prearricchimento ad ogni livello di contaminazione è stato sottoposto ad estrazione utilizzando il kit del commercio per l'estrazione del DNA seguendo il protocollo per batteri Gram negativi, da noi ottimizzato sulla matrice mangime. Brevemente, il surnatante ottenuto da ogni campione dopo centrifugazione ($1000 \times g$ per 3 min.), è stato sottoposto a lisi chimica e successiva purificazione del DNA mediante colonne di affinità.

- Metodo 2: estrazione con proteinasi K

1 ml del brodo di prearricchimento ad ogni livello di contaminazione è stato sottoposto ad estrazione con proteinasi K. Brevemente, il surnatante ottenuto da ogni campione dopo centrifugazione ($1000 \times g$ per 3 min.), è stato sottoposto a lisi chimica mediante proteinasi K per 1 ora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e successiva inattivazione dell'enzima a $99 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10 min.

- Metodo 3: Bollitura

Il surnatante ottenuto da ogni campione dopo centrifugazione ($1000 \times g$ per 3 min.), è stato sottoposto a lavaggio e bollitura a $99 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10 min. L'estratto ottenuto è stato diluito 1:10 in TE 0,1X ed utilizzato per la PCR.

Sensibilità dei metodi di estrazione. Allo scopo di valutare la sensibilità dei metodi di estrazione testati, gli estratti ottenuti con i tre protocolli sono stati sottoposti al medesimo protocollo di amplificazione.

Amplificazione

E' stata allestita una PCR che amplifica un frammento di 284bp del genoma batterico codificante per una Kinesina-like protein (gene *invA*) situata sulla parete batterica e responsabile dell'invasività del batterio (2)

Per l'amplificazione è stata utilizzata una *Taq* polimerasi Hot-Start (kit AccuPrime™ *Taq* DNA polymerase System, Invitrogen). In particolare, in 25 µl totali vengono miscelate le seguenti componenti: 200 nM di ogni primer (*invA*1: GTGAAATTATCGCCACG-TTCGGGCAA, *invA*2: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC) 2,5 µl di 10x AccuPrime™ PCR Buffer II, 1 µl di AccuPrime™ *Taq* DNA polymerase e 5 µl di estratto di DNA. Profilo di amplificazione: 1 X (94°C, 2 min), 40 X (94°C, 30 sec; 64°C, 1 min, 68°C, 1 min), 1 X (68°C, 7 min).

I prodotti di PCR sono stati analizzati con elettroforesi su gel di agarosio al 2% in 1X TAE buffer. I gel sono stati colorati con SyBr Safe (Invitrogen), e visualizzati su transilluminatore UV.

Risultati

Limite di rilevabilità dei metodi colturali. I due metodi colturali hanno dato il medesimo limite di rilevabilità di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. in 50 g di mangime. In nessun caso ci sono state differenze tra le due repliche di campioni analizzate (A e B) (Tab.1).

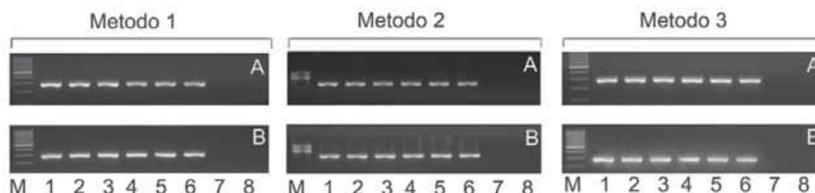
Limite di rilevabilità dei metodi PCR. I tre metodi PCR sono risultati avere tutti il medesimo limite di rilevabilità di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. in 50 g di mangime. In nessun caso ci sono state differenze tra le due repliche di campioni analizzate (A e B) (Fig.1).

Tab. 1. Limite di rilevabilità dei 2 metodi colturali e dei 3 metodi PCR

	Metodo	Limite di Rilevabilità
Colturale	ISO 6579(2002)/Cor1 (2004)	4 u.f.c./50 g
	ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D (2007)	4 u.f.c./50 g
PCR	Metodo di estrazione 1	4 u.f.c./50 g
	Metodo di estrazione 2	4 u.f.c./50 g
	Metodo di estrazione 3	4 u.f.c./50 g

Fig. 1. Limite di rilevabilità dei 3 metodi di estrazione.

M = Marker di peso molecolare; lane 1 = 4 x 10⁵ u.f.c./50 g; lane 2 = 4 x 10⁴ u.f.c./50 g; lane 3 = 4 x 10³ u.f.c./50 g; lane 4 = 4 x 10² u.f.c./50 g; lane 5 = 40 u.f.c./50 g; lane 6 = 4 u.f.c./50 g; lane 7 = 0,4 u.f.c./50 g; lane 8 = 0,004 u.f.c./50 g.



DISCUSSIONE

Il metodo PCR ottimizzato in questo studio ha permesso di rilevare anche basse concentrazioni di *Salmonella* spp. in campioni di mangime artificialmente contaminati. I tre metodi di estrazione hanno, infatti, mostrato il medesimo limite di rilevabilità di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. per 50 g di mangime.

Lo stesso limite di rilevabilità è stato rilevato anche nei 2 metodi colturali testati in parallelo sui medesimi campioni: ISO 6579(2002)/Cor1 (2004) “Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.” e ISO 6579:2002/ Amd 1:Annex D: “Detection of *Salmonella* spp. In animal faeces and environmental samples from the primary production stage (2007)”. Conseguentemente riteniamo che il metodo di estrazione del DNA per bollitura, essendo il più semplice e rapido tra i 3 testati (20 minuti circa), sia quello da preferire nelle applicazioni diagnostiche, in accordo con quanto riportato da analoghi studi della letteratura (1).

Concludendo, riteniamo che il metodo sviluppato, qualora confermi le stesse performance anche su campioni naturalmente contaminati, mostrando limite di rilevabilità analogo al metodo colturale di riferimento ISO 6579(2002)/Cor1 (2004), possa essere applicato alla ricerca routinaria di *Salmonella* spp da campioni di mangime.

Bibliografia

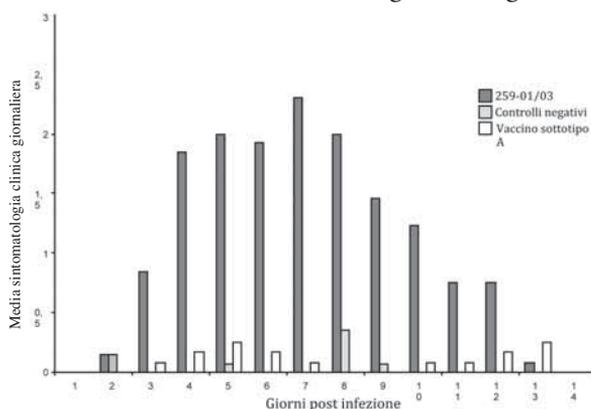
De Medici D., Croci L., Delibato E., Di Pasquale S., Filetici E., Toti L. 2003 Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real Time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in poultry”. Applied. Environ. Micobiol. 69:3456-3461.

1. Rahn K., De Grandis S.A., Clarke R.C., McEwen S.A., Galan C., Ginocchio R., Curtis III R., Gyles C. L. 1992 Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes 6:271-279.

2. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards - Question No EFSA-Q-2007-045 - 5 Giugno 2008

http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753820_1211902004131.h

Figura 1. Andamento delle medie della sintomatologia clinica giornaliera.





ALPHARMA.

Animal Health

**intestino in salute,
affari in salute**



www.alphaarmaah.com

AlphaPharma Belgium | Laarstraat 16 | B-2610 Antwerp | Belgium | Tel +32 (0) 3 287 38 80 | Fax +32 (0) 3 287 38 81
AlphaPharma Inc., 440 Route 22 East, Bridgewater, NJ 08807, USA

PROGETTO EUROPEO ECORAIP: EUROPEAN CONTENT FOR PUBLIC HEALTH AWARENESS OF RURAL POPULATION ON AVIAN INFLUENZA PREVENTION (2007—2008)

Vida Patrizia¹, Mammone Teresa¹, Lavazza Antonio², Moretto Angelo²

¹*Centro Internazionale per gli Antiparassitari e la Prevenzione Sanitaria - Ospedale "Luigi Sacco" – Milano (Italia)*, ²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna –Brescia (Italia)*

Introduzione

La popolazione rurale si colloca in una posizione cruciale nella catena di trasmissione potenziale del virus dell'influenza aviaria negli esseri umani. Coloro che risiedono in aree rurali, possono venire facilmente in contatto con il virus, soprattutto nei periodi in cui virus ad alta patogenicità circolano negli uccelli selvatici (specie serbatoio). In molte aree rurali dei 25 paesi membri dell'Unione Europea manca spesso una corretta informazione e conoscenza delle più semplici indicazioni in materia.

Il progetto Europeo "ECORAIP: European content for public health awareness of rural population on avian influenza prevention (2007-2008)" è stato finanziato dalla Public Health Executive Agency (PHEA) con Agreement n. 20067 (<http://ecoraip.eu/>) e si propone di fornire alla popolazione residente in aree rurali un'informazione che comprenda anche linee guida per la prevenzione delle epidemie di influenza, in particolar modo di influenza aviaria.

Il materiale così prodotto potrà essere uno strumento utile alle amministrazioni e istituzioni Europee, Internazionali, Nazionali e Locali per l'implementazione di campagne di prevenzione e informazione.

La partnership del progetto è composta da cinque istituti di ricerca, ognuno di questi costituente il 'team nazionale' per proprio paese (Grecia - coordinatore, Italia, Germania, Polonia, Cipro). Gli Istituti coinvolti sono: Università di Atene (Grecia), Centro Internazionale per gli Antiparassitari e la Prevenzione Sanitaria - Ospedale "Luigi Sacco" – Milano (Italia), Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna –Brescia (Italia), NOFER Institute of Occupational Medicine – Lodz (Polonia), Research Association Public Health – Dresden (Germania), Harvard School of Public Health – Nicosia (Cipro).

Metodi

Come base di partenza è stata effettuata una revisione della letteratura esistente in materia, soprattutto per gli aspetti epidemiologici della malattia, l'individuazione di fattori o caratteristiche specifiche che hanno contribuito in passato all'infezione umana.

In seguito ogni team nazionale ha approfondito questi aspetti, nonché lo stile di vita nelle aree rurali, sia per il proprio paese che per un'ulteriore nazione assegnata (geograficamente o culturalmente vicina), in modo da portare alla luce anche eventuali differenti pratiche e abitudini nelle diverse zone dell'Europa.

Per funzionalità, il territorio dell'Unione è stato suddiviso in tre macroaree, dove le caratteristiche (sia strutturali che sociali) del settore agricoltura/allevamento in

aree rurali risultassero simili. Si sono così individuate tre Sub-Regioni Europee: Centro-settentrionale, Meridionale e Orientale. È stata inoltre verificata l'attuazione di eventuali campagne di prevenzione o informazione sul territorio.

Risultati

Dall'elaborazione del materiale raccolto è stato prodotto un set di linee guida o 'lista di comportamenti idonei' mirate alla prevenzione dell'influenza aviaria in aree rurali. Questa lista di 'buone pratiche' è stata riadattata secondo le diverse problematiche rilevate per ogni Sub-Regione.

La fase finale del progetto ha riguardato l'applicazione di queste linee guida per mezzo di alcuni studi pilota condotti in alcuni comuni 'rurali' dei paesi partecipanti. Sono stati così organizzati, grazie anche al supporto e alla disponibilità delle autorità locali, degli incontri 'ad hoc' con la popolazione residente (considerata un campione rappresentativo della popolazione rurale), durante i quali le linee guida sono state illustrate con una presentazione orale e tramite la circolazione di un apposito opuscolo a vignette tradotto nella lingua nazionale.

Per capire se le informazioni contenute fossero di facile comprensione, quindi funzionali all'obiettivo preposto, durante gli incontri è stato somministrato un questionario prima e dopo la presentazione, contenente una serie di domande sia generali che più specifiche in materia di igiene e prevenzione. L'elaborazione dei risultati dei questionari raccolti ha permesso di apportare alcune modifiche nel set di linee guida in modo per renderle ancor più accessibili e comprensibili, e di produrne il formato definitivo, disponibile a breve.

INDICE DEGLI AUTORI

Agnoletti F., 50, 54, 70
 Aiudi G., 46

 Bacchin C., 50, 70
 Bano L., 50, 54, 70, 78
 Battistacci L., 74
 Benedetti V., 93
 Bianchi E., 111
 Bonci M., 50, 54, 70
 Brown P.A., 91
 Brown P., 88, 107

 Çabeli P., 83
 Camarda A., 57, 83
 Casagrande Proietti P., 74
 Catania S., 35
 Catelli E., 88, 91, 93, 98, 107, 111
 Cecchinato M., 88, 98, 107, 111
 Ceruti R., 57
 Cibin V., 11
 Circella E., 57, 83
 Cocchi M., 50, 54, 70
 Colmegna S., 63
 Corsale E., 63

 Di Paola G., 83
 Drigo I., 50, 54, 70

 Falchieri M., 91, 111
 Ferrazzi V., 63
 Franciosini M.P., 74

 Gallazzi D., 78
 Ganapathy K., 93
 Gavazzi L., 17
 Giovanardi D., 57
 Grilli G., 63
 Guolo A., 54, 70

 Invernizzi A., 63

 Jones R.C., 93
 Kika A., 83
 Kleven S.H., 29
 Kumbe I., 83

 Lacalandra G.M., 46
 Lavazza A., 121
 Lemiere S., 93
 Lupini C., 88, 93, 98, 107, 111

 Madio A., 83
 Mammone T., 121
 Marcon B., 50
 Mascher A., 63
 Massi P., 101, 103, 116
 Meini A., 111
 Montiel E., 93
 Moretto A., 121
 Morrow C., 41
 Moscati L., 74

 Naylor C.J., 88, 91, 98, 107
 Nicassio M., 46

 Ortali G., 17

 Pagana G., 46
 Pela M., 74
 Pennelli D., 57
 Piva A., 103

 Ricci A., 11
 Ricchizzi E., 88, 93, 107, 111

 Saita M., 78
 Shtylla T., 83
 Silvestre F., 46
 Spada D., 88

 Tacconi G., 74
 Taddei R., 116
 Tagliabue S., 57
 Tamba M., 19
 Terregino C., 13
 Tosi G., 35, 101, 103, 116

 Vascellari M., 50
 Vandi L., 103
 Vida P., 121
 Vinco L.J., 17

Finito di stampare
nel mese di marzo 2009
da La Ducale Srl - Parma