



Camera di Commercio
Forlì-Cesena



www.merial.com



ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE 2010



SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 2010



XLIX Convegno annuale

Forlì, 29-30 Aprile 2010

In copertina: dipinto di **Robert A. Johnson**, “**November Chickens**”

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2010**

Food for professionals



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

Indice

Prefazione	pag. 9
------------------	--------

**ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA
IL REGOLAMENTO DI POLIZIA VETERINARIA:
QUANTO È CAMBIATO E QUANTO ANCORA È DA CAMBIARE
NEL SETTORE AVICOLO**

Perugia, 23 Ottobre 2009

- *Paola Fossati* - Il regolamento di Polizia Veterinaria e le malattie aviari: principi normativi.. pag. 13
- *Daniele Gallazzi, Guido Grilli* - Il Regolamento di Polizia Veterinaria e le malattie aviarie: quanto è adeguato rispetto alla conoscenze ed alla situazione epidemiologica attuale..... pag. 17
- *Lebana Bonfanti* - Esperienze recenti di modifiche delle norme di intervento: influenza aviare e salmonelle..... pag. 21
- *Maria Pittman* - Current strategies and indications for future strategies to control avian diseases pag. 29
- *Gaetana Ferri* - Ruolo del Governo Centrale per la gestione ed il controllo delle malattie aviari pag. 41

ATTI DEL XLIX CONVEGNO ANNUALE

Forlì, 29-30 Aprile 2010

INCONTRO:

**LE PRINCIPALI TEMATICHE DI CARATTERE SANITARIO CHE HANNO
CARATTERIZZATO L'ULTIMO SCORCIO DEL 2009 E L'INIZIO DEL 2010**

- *Veronica Cibir, Antonia Ricci* - ATTIVITÀ DEL CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LE SALMONELLOSI NEL 2009-2010..... pag. 55

CONVEGNO:

**DISINFEZIONE, DISINFESTAZIONE E DERATTIZZAZIONE:
ANELLO FONDAMENTALE DELLA BIOSICUREZZA IN AVICOLTURA**

- *Agostino Macrì* - DISINFEZIONE E DISINFESTAZIONE IN AVICOLTURA: ASPETTI LEGISLATIVI ED UTILIZZO DEI PRINCIPI ATTIVI..... pag. 61

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- *Bano L., Giovanardi D., Morandini E., Tonon E., Drigo I., Bonci M., Agnoletti F* - EPISODIO DI BOTULISMO IN POLLI DA CARNE: RILIEVI DIAGNOSTICI..... pag. 67
- *Bano L., Bacchin C., Marcon B., Drigo I., Bonci M., Agnoletti F* - FARMACOSENSIBILITÀ DI CLOSTRIDIUM PERFRINGENS NETB POSITIVI E NETB NEGATIVI ISOLATI DA POLLO E DIFFUSIONE DI ALCUNI GENI DI RESISTENZA..... pag. 73
- *Bano L., Bonci M., Drigo I., Ferro T., Vascellari M., Cesca A., Agnoletti F* - SPONDILITE DA ENTEROCOCCUS CECORUM NEL POLLO DA CARNE - poster..... pag. 81
- *Bertrand H., Pinoia F* “L’ECOLOGIA MICROBICA DIRETTA” UNA SOLUZIONE ALTERNATIVA PER IL CONTROLLO DELLA POPOLAZIONE MICROBICA CONTAMINANTE - **POSTER**..... pag. 86
- *Billi L., Dall’Ara A., Golfari G., Massi P., Poglayen G.* - TECNOLOGIA BIOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DI POLLINA DI OVAIOLE (BREV. EUROPEO EP 1314710 A1): OTTIMIZZAZIONE PER CARBONIO E AZOTO..... pag. 89
- *Bonoli A., Dall’Ara A., Gagliardi S., Golfari G., Massi P., Nonni S., Poglayen G.* - TECNOLOGIA BIOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DI POLLINA DI OVAIOLE (BREV. EUROPEO EP 1314710 A1): VALUTAZIONE ECONOMICA DELLA PRODUZIONE IN SITU DEL FERTILIZZANTE pag. 97
- *Borrelli L., Dipineto L., Mirabile M., Pisano S., Gargiulo A., De Luca Bossa L., Russo T., Calabria M., Sensale M., Santaniello A., Rinaldi L., Cringoli G., Menna L.F., Fioretti A.* - ATOXOPLASMOSE NELL’ALLEVAMENTO DEL CARDELLINO (CARDUELIS CARDUELIS). **POSTER**..... pag.113
- *Catania S., Ramirez A.S., Gobbo F., Brustolin M., Dare C. M., Bradbury J. M.* - DIFFERENZIAZIONE DI DUE CEPI DI MYCOPLASMA SYNOVIAE DA CAMPIONI DI TRACHEA E OVIDUTTO PROVENIENTI DA UN ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE pag. 115
- *Catania S., Ceruti R., Mingardo M., Ortali G., Terregino C., Job L.* - INDAGINE PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI MYCOPLASMA GALLISEPTICUM E MYCOPLASMA SYNOVIAE IN ALLEVAMENTI AVICOLI ITALIANI pag. 117
- *Catania S., Gobbo F., Quattieri K., Bilato D., Job L., Nicholas R.A.J.* - ISOLAMENTO DI MYCOPLASMA SYNOVIAE IN UN ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE IN RELAZIONE AD ALTERAZIONI APICALI DEL GUSCIO (EGGSHELL APEX ABNORMALITIES)..... pag. 121
- *Fiorentini L. Taddei R., Massi P., Tosi G.* - PROVA DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEI CONFRONTI DI 70 CEPI DI SALMONELLA SPP. (S. ENTERITIDIS, S. TYPHIMURIUM, S. HADAR, S. VIRCHOW E S. INFANTIS) DI ORIGINE AVICOLA pag. 123
- *Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Massi P.* - STUDIO SULLA PREVALENZA DELLA SALMONELLA ISOLATA DA MATRICI DI ORIGINE AVICOLA IN TRE ANNI DI ATTIVITÀ DIAGNOSTICA (2007, 2008, 2009)..... pag. 133

• <i>Giacomelli M., Menandro M.L., Pasotto D., Piccirillo A.</i> - INDAGINE SULLA PRESENZA E LA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI CAMPYLOBACTER TERMOFILIS ISOLATI DA POLLI BROILER IN NORD ITALIA	pag. 151
• <i>Giovanardi D., Pesente P., Rossi G., Lupini C., Morandini E., Catelli E., Ortali G.</i> - IMPORTANZA DELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO NEI CASI DI ZOPPIA DEL POLLO E DEL TACCHINO	pag. 161
• <i>Golfari G., Dall'Ara A., Massi P., Poglayen G.</i> - TECNOLOGIA BIOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DI POLLINA DI OVAIOLE (BREV. EUROPEO EP 1314710 A1): PROGETTO MIDA (MANURE HYGIENIZATION DEVELOPMENT AND APPLICATION) SANITIZZAZIONE	pag. 167
• <i>Lupini C., Cecchinato M., Ricchizzi E., Pesente P., Sperati Ruffoni L., Catelli E.</i> - DISCRIMINAZIONE RAPIDA FRA CEPPI VACCINALI E DI CAMPO DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE, MEDIANTE TECNICA RFLP	pag. 177
• <i>Massi P., Fiorentini L., Taddei R., Barbieri I., Tosi G.</i> - EPISODIO DI "FALSE OVAIOLE" IN GALLINE OVAIOLE DI 22 SETTIMANE DI ETÀ IN SEGUITO AD INFEZIONE DA VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE DENOMINATO QXLIKE	pag. 181
• <i>Massi P., Tosi G., Taddei R., Fiorentini L., Sani P.</i> - INFEZIONE SPERIMENTALE CON I CEPPI DI CAMPO "ITALY-02", "QXLIKE" E "793B" DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN POLLI DA CARNE COMMERCIALI VACCINATI CON VACCINO VIVO CONTENENTE I CEPPI H120 E D274	pag. 187
• <i>Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Taddei R.</i> - TOSSINFEZIONE DA BOTULISMO IN POLLI COMMERCIALI	pag. 195
• <i>Moreno A., Barbieri I., Ceruti R., Morandini E., Cordioli P.</i> - CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEI CEPPI DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO ISOLATI IN ITALIA NEL PERIODO 2006-2009	pag. 199
• <i>Pizzuto M.S., De Battisti C., Marciano S., Capua I., Cattoli G.</i> - UTILIZZO DEL PYROSEQUENZIAMENTO PER UNA RAPIDA CLASSIFICAZIONE DELLE SPECIE DI ADENOVIRUS AVIARI DEL GRUPPO I	pag. 205
• <i>Rossi A.</i> - USO DELLA TILVALOSINA (AIVLOSIN®, ESTEVE S.P.A.) IN DUE GRUPPI DI TACCHINI COMMERCIALI BIG 6 AFFETTI DA MYCOPLASMA GALLISEPTICUM E MYCOPLASMA SINOVIAE. PROVA COMPARATIVA ESEGUITA A CONFRONTO CON TILOSINA E OSSITETRACICLINA	pag. 211
• <i>Toffan A., Catania S., De Battisti C., Salviato A. & Cattoli G.</i> - INFEZIONE SPERIMENTALE DI TACCHINOTTI CON DIVERSI ASTROVIRUS AVIARI: RISULTATI PRELIMINARI	pag. 215
• <i>Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Fiorentini L., Massi P.</i> - CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DI VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE ISOLATI IN ITALIA NEL PERIODO 2007-2009 E NEL PRIMO BIMESTRE DEL 2010	pag. 217
INDICE DEGLI AUTORI	pag. 229

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

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

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2010 sono realizzate grazie al contributo di:

- ALPHARMA ANIMAL HEALTH
- AVIAGEN
- BAYER SANITÀ ANIMALE
- CEVA VETEM
- CHEMIFARMA
- DOX AL ITALIA
- ELANCO ANIMAL HEALTH
- ESTEVE VETERINARIA
- FATRO
- HUVEPHARMA
- INTERVET/SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH
- IZO
- LOHMANN ANIMAL HEALTH
- MERIAL ITALIA
- NOVARTIS
- PFIZER ITALIA
- TRE I
- UNITEC ITALIA

PREFAZIONE

A livello nazionale il comparto avicolo, sia da carne sia da uova, ha raggiunto traguardi produttivi e qualitativi impensabili fino a qualche anno fa. È conosciuta da tempo anche la sicurezza dei prodotti avicoli e la fiducia del consumatore aumenta di anno in anno.

Per ottenere questi risultati, però, è necessario che in allevamento sia garantito un ambiente idoneo tale da preservare gli animali dalle malattie, ma al tempo stesso garantirgli il pieno rispetto del benessere.

Sono molte le procedure igienico-sanitarie che riducono il rischio d'introduzione e diffusione di agenti causali di malattia. Queste procedure, comunemente conosciute come norme di "biosicurezza", se correttamente applicate in allevamento, contribuiscono a evitare l'ingresso degli agenti patogeni.

Tra queste rivestono importanza fondamentale tutte quelle pratiche di pulizia e disinfezione, che normalmente sono adottate a fine ciclo. Queste pratiche, se ben condotte e associate ad altri interventi igienico-sanitari (es. vaccinazioni), contribuiscono al controllo delle patologie facendo diminuire anche l'utilizzo di antibiotici.

Infatti, avere un efficace programma di pulizia, disinfezione e disinfestazione è un punto cruciale di ogni programma di biosicurezza del pollame allevato.

Per tale motivo, supportati anche dalle richieste dei colleghi di campo che normalmente si ritrovano a dover fare delle scelte tecniche sulle procedure e sui principi attivi da utilizzare in tale contesto, nel corso del 49° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria si è deciso di affrontare il tema della "Disinfezione, disinfestazione e derattizzazione quale anello fondamentale della biosicurezza in avicoltura".

Lo scopo dell'incontro è quello di fornire un aggiornamento sugli aspetti legislativi inerenti l'utilizzo dei vari principi attivi, anche in virtù delle nuove normative europee, nonché di fornire indicazioni procedurali chiare e facilmente applicabili in campo.

A tale scopo il Convegno sarà articolato in diversi interventi che vedranno coinvolte figure di spicco della Sanità Pubblica Veterinaria e noti esperti della materia che ben conoscono la situazione degli allevamenti avicoli nazionali.

Dr. Guido Grilli
Presidente SIPA

Curiamo i vostri animali al meglio perchè rendano al massimo.

La redditività di un moderno allevamento zootecnico dipende in larga misura dalla salute e dal benessere degli animali. Per questo Novartis Animal Health, società multinazionale del settore farmaceutico, è impegnata da anni a ricercare, sviluppare e commercializzare prodotti veterinari in grado di combattere le più importanti patologie degli animali da reddito ed assicurare loro un ambiente di vita più salubre.

Animali in buona salute, più rilassati, producono di più e meglio, grazie alle soluzioni terapeutiche d'avanguardia di Novartis Animal Health, sviluppate nel rispetto dei più rigidi standard di eccellenza qualitativa per garantire efficacia, tollerabilità, sicurezza. E massima resa.



ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA

**Il regolamento di Polizia Veterinaria:
quanto è cambiato e quanto ancora
è da cambiare nel settore avicolo**

Perugia, 23 Ottobre 2009

PAOLA FOSSATI

**Il regolamento di Polizia Veterinaria e le
malattie aviari: principi normativi**

Società Italiana di Patologia Aviare
TAVOLA ROTONDA: Il regolamento di Polizia Veterinaria:
quanto è cambiato e quanto ancora è da cambiare nel settore avicolo
Perugia, 23 ottobre 2009

Il Regolamento di Polizia Veterinaria e le malattie aviari: principi normativi

Paola Fossati
Sezione di Medicina Legale e Legislazione Veterinaria
Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie
Università degli Studi di Milano

La storia



- 1714 Papa Clemente VII
- profilassi diretta per contenimento epizoozie
 - Isolamento soggetti patologici
 - Disinfezione e distruzione del materiale infetto o sospetto (*stamping out*)
 - No spostamenti di persone

Polizia Veterinaria



- Inizi del '900
 - "norme di massima per impedire la diffusione delle malattie infettive e diffusive degli animali"
- 10 maggio 1914, R.D. n. 533
 - "Regolamento speciale di polizia veterinaria"
 - Finalità di profilassi zootiatrica
 - Tutela della salute dell'uomo

Tra i provvedimenti:

- Al Sindaco il potere di ordinare l'**isolamento**
 - Chiusura del pollame sano degli allevamenti vicini a quelli infetti



- Al Prefetto:
 - Il compito di emanare il **decreto di zona infetta**
 - la facoltà di imporre **abbattimento e distruzione** dei soggetti patologici e sospetti
 - la facoltà di ordinare la chiusura delle colombaie nelle zone infette e "**nel territorio circostante**" (*zona di protezione*)
 - La disposizione di trattamenti immunizzanti a opera del veterinario

D.P.R. 8 febbraio 1954 n. 320

- 40 anni dopo → modifica
 - Aggiornamento
 - Ampliamento numero malattie del pollame soggette a denuncia
- Ordinanze
 - Arricchimento e modifica
 - Numero malattie soggette a denuncia
 - Metodi di contenimento

O.M. 19 luglio 1991

- Al Prefetto il potere di
 - stabilire la **zona di protezione**
 - rendere **obbligatori i trattamenti immunizzanti**
 - vietare la raccolta ambulante dei volatili e delle uova (art. 152)
- Provvedimenti per casi di influenza aviaria e pseudopeste aviaria **da ceppi virali altamente virulenti** (O.M. 19 luglio 1991)

- Influenza aviaria e pseudopeste aviaria (afezioni pestose)
- Modificata virulenza del virus come condizione per la denuncia
- Possibilità di abbattimento forzato di animali e relativo indennizzo
- "modificata patologia infettiva del pollame anche in relazione alle **nuove tecniche di allevamento**" (*tecnopatie*)

- Influenza del passaggio all'allevamento intensivo
 - animali
 - patologie
 - tecnologie di allevamento
 - professionalità dell'operatore
- Agente infettivo + ambiente e management
 - Variabilità
 - Patologia non statica

- Notevole dimensione impianti
- Ingente numero animali
- Importanza dell'aspetto sanitario
- Definire l'azione di controllo
 - Ruolo impositivo-poliziesco ?
 - Allevatore sulla difensiva ?
 - Fiducia
 - Convinzione

Strumento Ordinanza

- Provvedimenti integrativi e di modifica del Regolamento di Polizia Veterinaria
 - rispondere a esigenze non previste
- Inizio della revisione del R.P.V.
 - individuazione delle patologie
- Dalle misure di controllo ai piani sanitari
 - scopi profilattici anziché di cura

Sanità animale europea

- Apertura europea del mercato
 - caduta delle barriere tecniche e fisiche
- Elenchi "europei" di malattie infettive
 - reale stato sanitario del territorio
- Valenza giuridica dell'elenco OIE di malattie soggette a denuncia
 - pacchetto igiene

Malattie soggette a denuncia

D.P.R. n. 320/54	D. Lgs. n. 28/93	Lista OIE
Colera aviare		
Affezioni pestose (peste e pseudopeste aviaria)	Malattia di Newcastle Influenza aviaria	Malattia di Newcastle Peste aviaria
Diftero-vaiole		
Tifosi aviare		
Pullorosi		
Laringotracheite infettiva		
Encefalomyelite aviare		

- Applicazione della norma
- Reale incidenza del R.P.V. sulla sanità in rapporto a queste patologie
- Il R.P.V. è adeguato ai tempi e agli obiettivi di sanità animale e vigilanza veterinaria permanente?

- Necessità di acquisire dati epidemiologici e statistici sulla sanità dei volatili
- Denuncia o segnalazione ?

ALLEVAMENTI AVICOLI IN ITALIA – 22 OTTOBRE 2000 – DISTRIBUZIONE N. CAPI

Regione	Altri allevamenti avicoli	Faraone	Ovaiole	Oche	Polli da carne	Tacchini	Totale
Totale	12.408.249	4.150.814	44.781.166	356.887	90.708.718	12.937.490	171.343.324

Fonte: ISTAT – CENSIMENTO AGRICOLTURA 22 OTTOBRE 2000

Proposta di modifica

- **Differenziare** malattie infettive aviare altamente diffuse (lista OIE) - altre patologie che non giustificano misure molto restrittive
- Adeguamento **comunitario**
- **Segnalazione** per le altre malattie aviare
- Strumento per applicazione di **misure restrittive** contingenti, **modulate** sui singoli contesti e sulle conoscenze scientifiche in materia

Cosa è cambiato – Cosa cambiare

- Prevalenza delle norme comunitarie
- Corte Costituzionale (2004), abrogazione norme incompatibili e sovrapponibili
 - Il Ministero emana una circolare che afferma l'abrogazione indiretta delle norme del R.P.V. in tale posizione
- Applicare principi E.B.P.
 - Eliminare atti di programmazione ripetitivi e in contrasto con il principio costi/benefici
 - Programmare solo atti di prevenzione efficace

"Non c'è bisogno di esagerare, né dobbiamo ignorare i rischi. Ma con un'intensa collaborazione tra allevatori, veterinari, organizzazioni professionali e una dose di auto-disciplina, tutti questi rischi rimarranno contenuti.

E' certo che per realizzare ciò abbiamo bisogno di un cambiamento radicale della mentalità di tutti gli interessati.

Gli allevatori e i veterinari devono formare un tandem, un duo per affrontare tutti i problemi veterinari in allevamento."

Prof. Y. Jannsen (Commissario CE)



DANIELE GALLAZZI, GUIDO GRILLI

**Il Regolamento di Polizia Veterinaria
e le malattie aviarie: quanto è adeguato
rispetto alla conoscenze ed alla situazione
epidemiologica attuale**



Facoltà di Medicina Veterinaria



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO

Il Regolamento di Polizia Veterinaria e le malattie aviarie: quanto è adeguato rispetto alla conoscenze ed alla situazione epidemiologica attuale

Daniele Gallazzi, Guido Grilli

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria
- Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria -

Tavola Rotonda: Il regolamento di Polizia Veterinaria: quanto è cambiato e quanto ancora è da cambiare
nel settore avicolo
Perugia, 23 ottobre 2009

REGOLAMENTO DI POLIZIA (?) VETERINARIA

Peste bovina – Epizootia europea XVIII sec.



Assolutamente incompreso ed incomprensibile...(ancora oggi?)

Testo di preghiera (!)

AVICOLTURA

- ☒ **Branca zootecnica "nuova"**
- ☒ **Si sviluppa subito in senso moderno (allevamenti intensivi....."pollo in batteria"**
- ☒ **Non fruisce di contributi statali**
- ☒ **Poco curata e seguita dalla veterinaria "ufficiale" (1966: prima cattedra universitaria di patologia aviaria....oggi solo 3 PO su 15 Facoltà)**
- ☒ **Difficoltà di adeguamento al RPV**
- ☒ **Veterinari pubblici non in sintonia con quelli di "campo"**
- ☒ **Scarsa collaborazione tra Istituzioni e veterinari avicoli con qualche eccezione (Veneto) (collaborazione sempre difficile: esempio delle distanze tra nuovi allevamenti avicoli)**
- ☒ **Elenco delle malattie infettive RPV (aggiornato al 2006)**

DPR 8 febbraio 1954 - Regolamento di Polizia Veterinaria (aggiornato al 2006)

Titolo I capo I

Malattie infettive degli animali soggetti a provvedimenti sanitari

.....omissis

17) Salmonellosi varie specie animali

.....

28) Malattie del pollame: colera aviaria, affezioni pestose, diftero-vaiole, tifo aviario, pullorosi.

....

31) Mixomatosi dei conigli e delle lepri....

....

33) Malattia cosiddetta respiratoria cronica (?)

34) Bronchite infettiva (?)

35) Corizza contagiosa

36) Laringo-tracheite infettiva

Capo II

Articolo 2:

"La denuncia è obbligatoria anche per qualunque nuovo caso di malattia o di morte improvvisa che si verifichi entro 8 giorni da un caso precedente non riferibile a malattia comune già accertata"

Articolo 11:

Ordinanza di zona infetta in caso di.....colera aviaria, di affezioni pestose aviarie....

Capo V

"Vigilanza sui concentramenti di animali e sulla raccolta e lavorazione degli avanzi animali"

Articolo 24:

Animali di istituti prodotti biologici

Scuderie, ippodromi

Canili

Sorveglianza circhi equestri

Suini allevati c/o caseifici

Allevamenti industriali animali da pelliccia e di animali destinati al ripopolamento di riserve di caccia.

Giardini zoologici

Titolo II

Articolo 104.

TBC: cani, gatti, scimmie e psittacidi affetti devono essere abbattuti

Articolo 123

carni di coniglio e volatili affetti da salmonellosi devono essere distrutte ai sensi dell'art. 10, lettera f del RPV

Capo XXVIII

Articolo 150

Malattie dei polli

OIE

Lista A

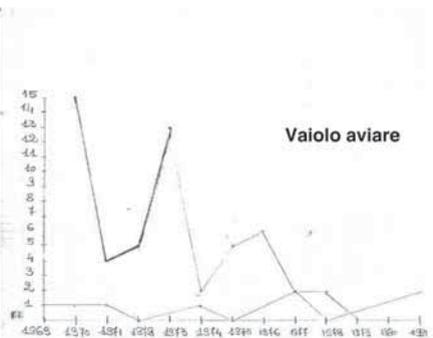
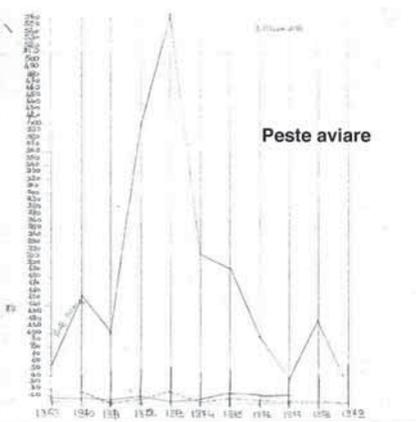
Influenza Aviaria ad alta patogenicità (LHPAI)

Malattia di Newcastle (NDV)

OIE - Lista B

- ☒ Bronchite Infettiva
- ☒ Malattia di Gumboro
- ☒ Colera Aviaria
- ☒ Enterite virale dell'anatra
- ☒ Epatite virale dell'anatra
- ☒ Laringo.-Tracheite infettiva
- ☒ Malattia di Marek
- ☒ *Mycoplasma gallisepticum*
- ☒ Pullorosi
- ☒ Tubercolosi aviaria
- ☒ Tifosi
- ☒ Vaiolo aviario

QUANTE SEGNALAZIONI SULLA BASE DEL RPV?



LEBANA BONFANTI

**Esperienze recenti di modifiche delle norme
di intervento: influenza aviare e salmonelle**

*"Il Regolamento di Polizia Veterinaria:
quanto è cambiato e quanto ancora è
da cambiare nel settore avicolo"*

*"Esperienze recenti di modifiche delle norme di
intervento: influenza aviare e salmonelle"*

Perugia 23 ottobre 2009



Un po' di storia ...



O.M. 19 luglio 1991
profilassi dell'influenza aviare e della pseudo-peste aviare

- Art.1 : E' riconosciuto il carattere infettivo e diffusivo ai sensi dell'art.1 del DPR 320/54 a:
 - Influenza aviare sostenuta da ceppi di virus altamente virulenti
 - Pseudo-peste aviare sostenuta da ceppi di virus altamente virulenti
- Art.2 Obbligo di denuncia di sospetto (superato dal DPR 656/96)
- Il sindaco può consentire lo spostamento dei volatili sani esistenti nel focolaio per scopi di macellazione (anche fuori regione)
- Raccolta delle uova da animali sani ai centri di imballaggio
- Il sindaco può disporre l'abbattimento degli animali presenti negli allevamenti infetti
- Dopo 15 gg rimozione misure zona infetta e ZP quando per i Servizi veterinari non sussistono più motivi che hanno determinato il provvedimento (??)



Salmonellosi

- DPR 320/54
- art.122il sequestro è tolto di norma dopo la guarigione dell'animale ammalato ma può essere mantenuto fino alla macellazione nel caso in cui l'animale risulti eliminatore di salmonelle patogene per l'uomo....
- Art.123 le carni dei conigli, le carni e le uova dei volatili affetti da salmonellosi devono essere distrutte ai sensi dell'art.10



REGOLAMENTO (CE) N. 2160/2003 DEL
PARLAMENTO EUROPEO E DEL
CONSIGLIO

del 17 novembre 2003

sul controllo della salmonella e di altri
agenti zoonotici specifici presenti negli
alimenti



EFSA - Relazione scientifica della task force sulla
raccolta dati sulle zoonosi - 31 marzo 2009

Analisi statistiche sono state condotte per la prima volta con i dati del 2006. L'obiettivo era quello di valutare la significatività statistica delle variazioni temporali della prevalenza, a livello comunitario, degli agenti zoonotici negli animali e della proporzione, sempre a livello comunitario, di unità alimentari positive. L'analisi del trend fornisce infatti informazioni sull'andamento nella Comunità e negli Stati membri e può chiarire gli effetti delle misure di controllo introdotte a livello comunitario o nazionale per ridurre l'incidenza degli agenti zoonotici.



Lo studio della distribuzione spaziale e temporale degli agenti zoonotici e delle zoonosi, mediante analisi spaziali e temporali specifiche, è un metodo valido per valutare l'andamento spaziale e temporale delle zoonosi. Pertanto, le analisi di cluster spaziali e spaziotemporali delle zoonosi è un settore importante per le future attività dell'EFSA.

Per quanto riguarda la Salmonella, sebbene il numero di casi sia stato in calo per il quarto anno consecutivo, nel 2007 le persone colpite dal batterio sono state 151.995 rispetto alle 164.011 del 2006.

"La Relazione 2007 sulle zoonosi mostra che molti batteri vengono ancora trasmessi dagli animali ai nostri alimenti. La diminuzione dei casi di salmonellosi, probabilmente grazie alle misure di controllo adottate lungo tutta la catena alimentare, costituisce un dato positivo", ha dichiarato il direttore responsabile per la cooperazione scientifica dell'EFSA, Hubert Deluyker.

Salmonella in allevamento e nelle carni (ovvero: quando l'UE contraddice se stessa?)

■ **Paradosso 1**

- In allevamento: lotta contro i 5 sierotipi rilevanti, "tolleranza" per gli altri
- In macello: nessuna distinzione tra sierotipi rilevanti e non, sono tutti sullo stesso piano (Reg. 2073/05)

Il Regolamento 2073/05 sui criteri di sicurezza alimentare distingue tra:

- a) **Criteri di Igiene del Processo**: fissano i limiti di carica microbica e/o di patogeni che forniscono informazioni sulle condizioni di igiene del **processo** (p.e.: macellazione o lavorazione delle carni).
- b) **Criteri di Sicurezza Alimentare** propriamente detti: fissano i limiti di carica microbica e/o di patogeni che danno informazioni sulle condizioni di igiene del **prodotto** (p.e.: arrosto, spiedino...).

■ **Paradosso 2**

Ora, lo stesso regolamento 2073 dice:

- il processo è "conforme" se vi sono non più di 7 campioni su 50 positivi per *Salmonella* (un campione è costituito da 25 grammi di "aggregato" di pelle del collo prelevata da 3 polli durante la macellazione, in sessioni diverse di macellazione);
- si applica, invece, tolleranza zero, in riferimento a *Salmonella* spp., per le preparazioni di carne (10 grammi di macinati, spiedini...) ottenute dai polli di cui sopra (che possono essere contaminati da *Salmonella* spp.) a prescindere dal sierotipo.

Quali conseguenze

- il primo caso (campioni di pelle di pollo) riguarda un **Criterio di Igiene del Processo**: il superamento del limite fissato (7/50 campioni positivi per *Salmonella* spp.) richiede una **intensificazione delle operazioni di pulizia e sanificazione** da parte dell'Operatore del Settore Alimentare mentre non c'è alcuna conseguenza sul prodotto;
- il secondo caso riguarda un **Criterio di Sicurezza Alimentare**: il superamento del limite fissato (ad esempio: 1 *Salmonella* spp. in un campione di carne macinata) comporta il **ritiro** del prodotto dal mercato e la "bonifica" (se possibile) o la **distruzione** della merce ritirata

● An overview of the epidemiology of avian influenza
 ● Dennis J. Alexander - Vaccine 25 (2007) 5637-5644

Table 1
 Reported highly pathogenic avian influenza isolates obtained from primary outbreaks in poultry* since 1959

HPAI virus	Subtype	Approximate numbers of poultry involved	
1	A/chicken/Scotland/59	H5N1	1 small farm
2	A/harkey/England/63	H7N3	29,000
3	A/harkey/Ontario/773/286	H5N9	8,000
4	A/chicken/Victoria/76	H7N7	58,000
5	A/chicken/Germany/79	H7N7	1 chicken farms, 1 goose farm
6	A/harkey/England/199/79	H7N7	9,000
7	A/chicken/France/Isont/1370/83	H5N2	17,000,000
8	A/harkey/Ireland/1378/83	H5N8	307,000, mostly ducks
9	A/chicken/Victoria/85	H7N7	240,000
10	A/harkey/England/50-4/291	H5N1	8,000
11	A/chicken/Victoria/1/82	H7N3	18,000
12	A/chicken/Queensland/667-6/94	H7N3	22,000
13	A/chicken/Mexico/8623-607/94	H5N2	Unknown—millions?
14	A/chicken/Pakistan/447/94	H7N3	~4,000,000
15	A/chicken/NW/97	H7N4	160,000
16	A/chicken/Hong Kong/97*	H5N1	3,000,000
17	A/chicken/Italy/03/97	H5N2	8,000
18	A/harkey/Italy/99	H7N1	14,000,000
19	A/chicken/Chile/2003	H7N3	~700,000
20	A/chicken/Netherlands/2003	H7N7	~25,000,000
21	A/chicken/Tanzania and Africa/2003-2006	H5N1	Unknown—100s of millions
22	A/chicken/Texas/2004	H5N2	6,400
23	A/chicken/Canada/BC/2004	H7N3	16,000,000
24	Alouatta/S. Africa/2004	H5N2	30,000

● Direttiva 92/40/CEE

- L'intento della UE all'inizio degli anni 80 era di definire misure per il controllo delle malattie che potessero garantire liberi commerci per i prodotti e gli animali. Il gruppo di esperti costituito in ambito comunitario aveva il compito di stabilire metodi condivisibili per la diagnosi e di controllo delle malattie. Le direttive influenza aviaria e ND sono il risultato del meetings of the European Community Expert Group on Contagious Diseases of Poultry, che si è tenuto dal 1984-1992.

● Direttiva 92/40/CEE

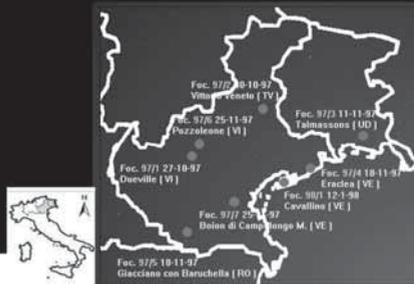
- D.P.R. 15 NOVEMBRE 1996, N.656 Regolamento per l'attuazione della direttiva 92/40/CEE che istituisce misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria
- Nessuna misura in caso di virus a bassa patogenicità
- Nei 60 anni precedenti al 1997 nessun focolaio a alta patogenicità era stato riportato in Italia (Capua et Al,2008)



1997-1998: EPIDEMIA AD ALTA PATOGENICITA'(H5N2)

Ottobre 1997-Gennaio 1998 - Veneto e Friuli V.G.

8 focolai ad alta patogenicità (circuitto rurale) 7731 capi coinvolti

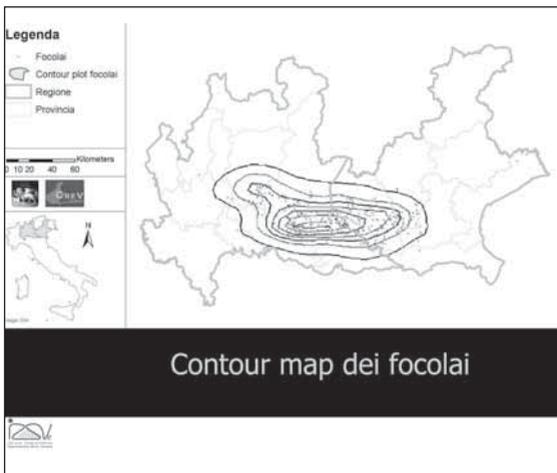
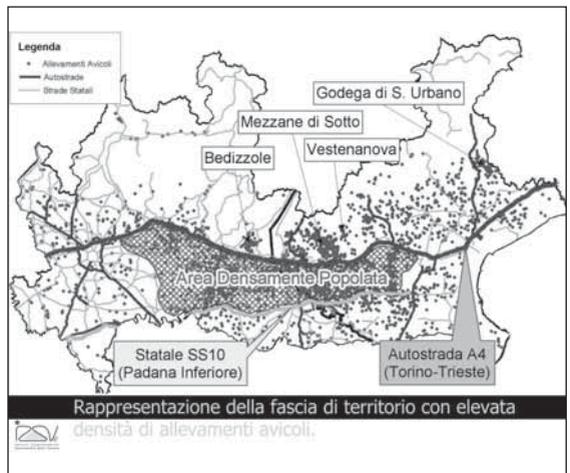
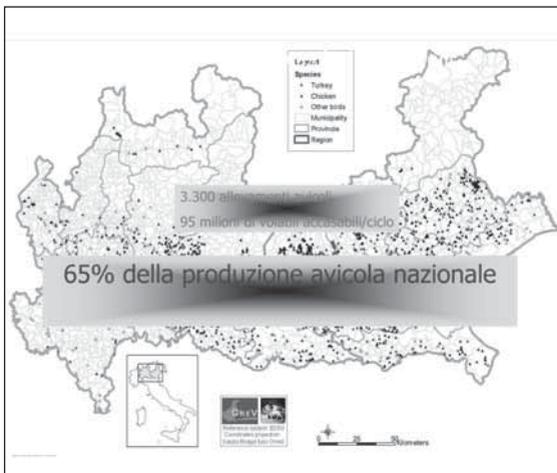
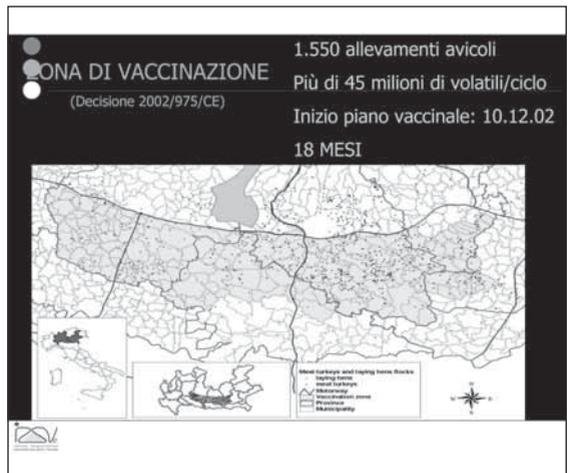
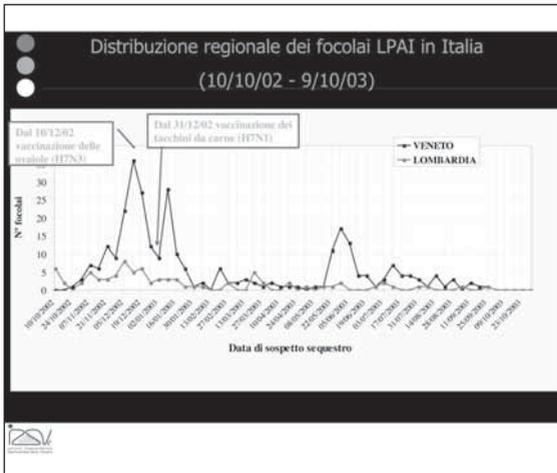


● 1999-2001: EPIDEMIA A BASSA ED ALTA PATOGENICITA' (H7N1)

17 dicembre 1999 -
 5 aprile 2000
 413 focolai ad alta patogenicità
 16 milioni di volatili morti/abbattuti

HPAI (H7N1) Epidemic in Italy
 Spatial distribution of infected sites
 05 May 2000



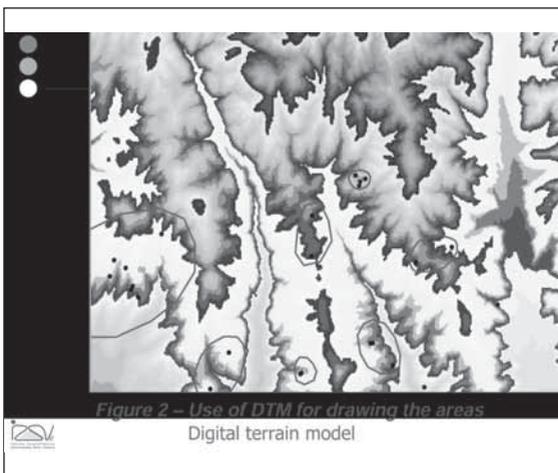
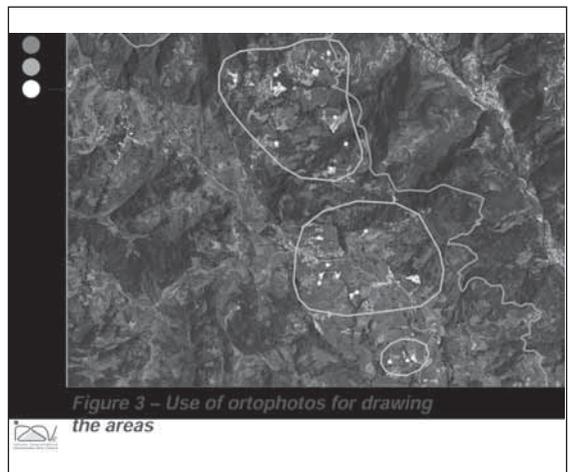
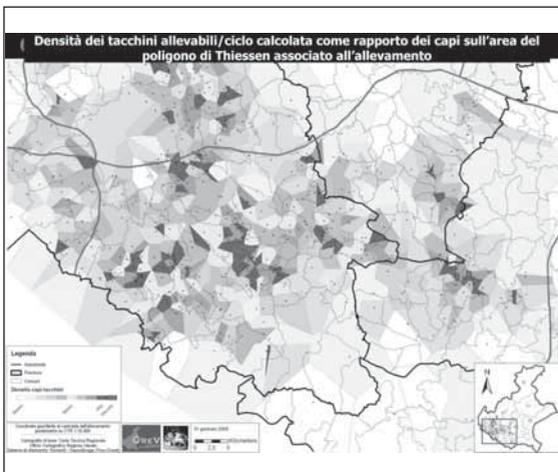
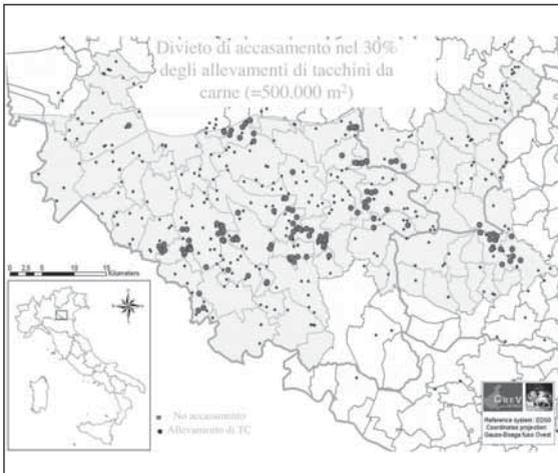


REGIONE DEL VENETO

PIANO REGIONALE PER LO SVILUPPO E LA RIGENERAZIONE DELLA FILIERA AVICOLA

Deliberazione della Giunta Regionale n. 2884
del 3 ottobre 2003

Assessorato alle politiche della Sanità
Assessorato alle politiche dell'Agricoltura



● Direttiva 2005/94/CE
● relativa a misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria e che abroga la direttiva 92/40/CEE

Questo è l'output....

..... molto è stato "concepito" a seguito delle epidemie di influenza aviaria in Italia

Che fare ora?

- La direttiva 2005/94/CE è uno strumento adeguato a gestire le epidemie di influenza aviaria?
- Stiamo applicando in modo adeguato le disposizioni previste dalla vigente normativa?
- Abbiamo definito livelli di intervento?
- Abbiamo assicurato una corretta catena di comando come previsto dagli standard dell'OIE?



Conoscenza della situazione per una corretta valutazione del rischio?



2000
Tot. ind. = 115.146
N. siti = 256

- 1 - 606
- 607 - 2377
- 2378 - 6294
- 6295 - 19236

INFS - DOTT GUBERTI

Germano reale siti di svernamento



OIE - Guidelines on veterinary legislation

2. The form of veterinary legislation

2.1 Normative character

- Veterinary legislation should be normative and should be drafted in a manner that prevents ambiguity in interpretation.

2.2 Style and precision

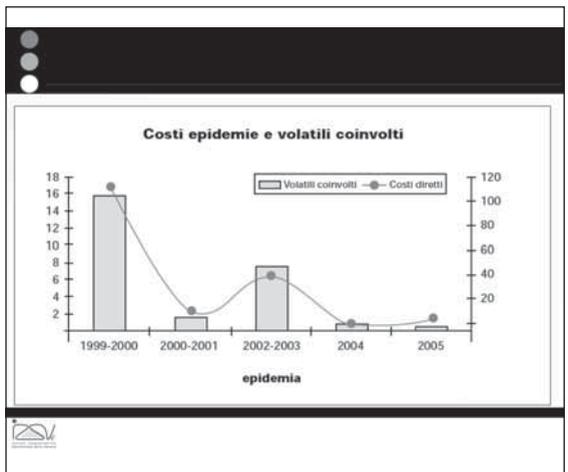
- The syntax and vocabulary should be clear and consistent so as to avoid any ambiguity.
- Precision and accuracy should take precedence over style even if this results in repetition and a cumbersome style.



- Veterinary legislation should provide for the financing of animal disease control measures, notably:
 - operational expenses;
 - production losses;
 - owners compensation in the event of killing or slaughtering of animals, seizure or destruction of carcasses, meat, animal feed or other things.



valutazione dell'impatto economico delle diverse misure sanitarie di lotta contro l'influenza aviaria

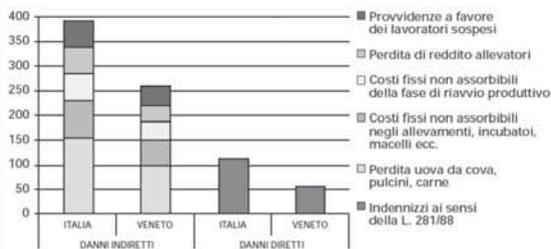



Caratteristiche delle epidemie LPAI (2000-2005)
negli allevamenti di Veneto e Lombardia

Epidemia	Durata epidemia (in mesi)	Totale focolai	Sottotipo e patogenicità	Focolai in allevamenti vaccinati	Allevamenti vaccinati	Danni diretti (in Euro)
2000-2001 ^a	7,2	78	H7N1 LPAI	1	293	10.000.000
2002-2003 ^b	11,6	379	H7N3 LPAI	88	731	40.000.000
2004 ^{ab}	2,8	28	H7N3 LPAI	27	652	617.000
2005 ^b	1,1	15	H5N2 LPAI	13	431	4.000.000

^a vaccinazione di emergenza con vaccino monovalente eterologo H7.
^b vaccinazione preventiva con vaccino bivalente H5/H7.

Costi diretti e indiretti HPAI 1999-2000



Valori in milioni di €

OIE Tool for the Evaluation of Performance of Veterinary Services

- The *OIE Tool for the Evaluation of Performance of Veterinary Services* is designed to assist VS to establish their current level of performance, to identify gaps and weaknesses regarding their ability to comply with OIE international standards, to form a shared vision with stakeholders (including the private sector) and to establish priorities and carry out strategic initiatives.

MARIA PITTMAN

**Current strategies and indications for
future strategies to control avian diseases**



ALPHARMA[®]

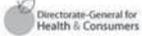
Animal Health

**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

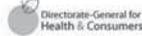



Current strategies and indications for future strategies to control avian diseases

Round Table Discussion, SIPA, Società Italiana Patologia Aviaria, Perugia, 23 October 2009

Dr. Maria Pittman
 European Commission, Directorate for Health and Consumers
 Unit D1 - Animal Health and Standing Committees

1

Overview

- Legislation on disease control
- Trade and imports
- Community Animal Health Strategy
- One World - One Health

2




EU legislation - Disease control

- Avian influenza and Newcastle disease



3




EU control measures for avian influenza (AI)

Council Directive 2005/94/EC



Influenza Virus
DWR: HEAD

- applicable as of 1 July 2007
- notification and graduated measures for:
 - highly pathogenic avian influenza (HPAI) and
 - low pathogenic avian influenza (LPAI) of H5 and H7 subtypes which have the potential to mutate into HPAI
- includes measures for **captive birds**

4




Avian influenza Directive

- **maintains classical disease control measures**
 - "stamping out" of infected flocks including pre-emptive culling of holdings at risk
 - safe disposal of carcasses
 - cleaning and disinfection
 - **zoning** (3km protection and 10km surveillance zones) with restrictions of movements
 - now also a larger **further restricted zone** around the surveillance zone can be established

5




AI Directive (2)

more flexibility – based on risk assessment

- **more stringent measures**
- "standstill" on the whole territory for movements of poultry, poultry products and vehicles of poultry sector - may also be extended to mammalian species
- "temporary control zone" can be established around a holding under AI suspicion e.g. relevant in densely populated poultry areas

6



AI Directive (3)

- **derogations from killing possible**
 - for HP/LP AI infected non commercial holdings, endangered species, zoo and pet birds etc.
 - epidemiological unit – shed based on local assessment
- **derogation from movement restrictions**
 - for hatcheries exemptions from establishing of protection and surveillance zones possible
 - movement of day-old chicks out of the areas under restrictions
 - movement of hatching eggs into and out of areas under restrictions
 - biosecurity measures for transport, restrictions on holdings of destination and as appropriate laboratory testing for authorisation of movements necessary

7



AI Directive (4)

- **pigs present on an AI infected poultry holding must be tested** – eventually also other species (e.g. cats)
- **Diagnostic manual**
Decision 2006/437/EC – sampling and testing procedures to confirm AI (new techniques, PCR)

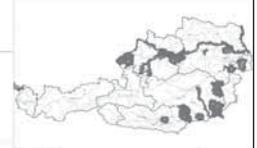
8



Additional control measures for HPAI H5N1

- **biosecurity measures and early detection systems**
- **notification of morbidity/mortality in wild birds**
- **additional zoning around outbreaks in poultry**
- **control measures when H5N1 detected in wild birds**

9



Biosecurity, early detection systems in poultry farms



- identification of "high risk areas"
- high density of migratory birds and poultry holdings
- prevention of contact between wild and domestic poultry
- require continuous review
- "alert criteria" - change in production data
- ducks might not show clinical signs

10



HPAI H5N1 in poultry

Decision 2006/415/EC

- **Area A (high risk)** including 3km protection & 10km surveillance zone established by the Directive
- **Area B (low risk)** - larger surrounding buffer zone
- additional restrictions for by-products e.g. game trophies, manure products, untreated feathers, pet food etc.
- area description published in EU Official Journal
- transparency for other MS and trading partners

11



HPAI H5N1 outbreak in the UK in February 2007



12



HPAI outbreaks in poultry from 2007-09

Year	No of outbreaks	HPAI subtype	No of MS affected	Member State and ev. type of holding
2007	26	H5N1	6 MS	CZ (4), DE (6), HU (2), PL (10), RO (1), UK (3)
2008	2	H7N7 H5N1	2 MS	UK: laying hens in free range (25.000) DE: mixed holding
2009	1	H7N7	1 MS	Spain 11/10 300.000 laying hens in closed holding

13



LPAI outbreaks in poultry in 2008/2009

- 2008: 38 outbreaks in 4 MS
 - Belgium (2)
 - Denmark (1)
 - Germany (32) of the H5N3 subtype
 - Italy (3)
- 2009: 44 outbreaks in 6 MS
 - Czech Republic (1)
 - Italy (34)
 - Spain (1)
 - Romania (1)
 - Germany (5)
 - France (2)

14



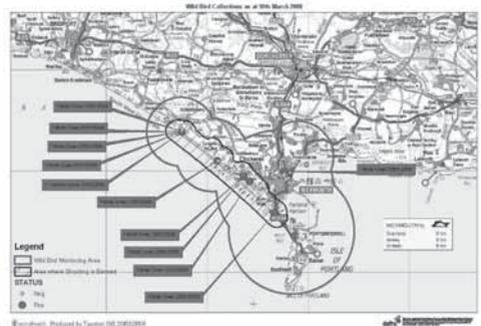
HPAI H5N1 in wild birds

- notification of increased disease or death in wild birds
- establishment of control & monitoring areas
- intensified wild bird surveillance
- investigations in poultry farms to exclude virus presence
- heightened biosecurity and movement restrictions in poultry farms
- prohibition on hunting, bird gatherings & game bird release

15



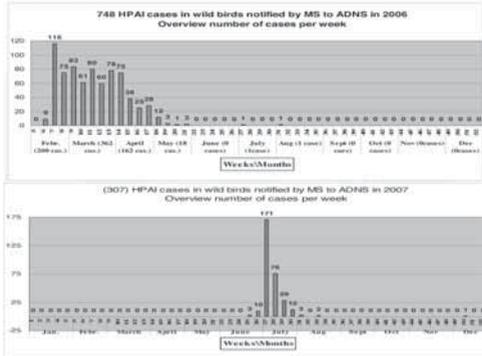
Control and monitoring areas UK 2008 (10 mute swans, 1 Canada goose)



16



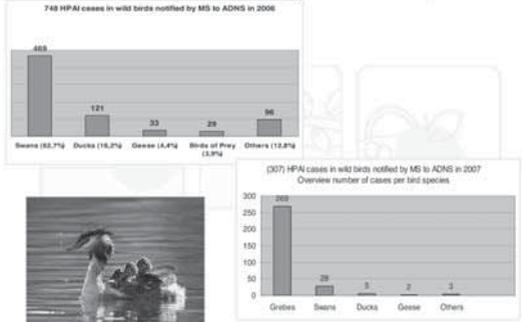
HPAI H5N1 in wild birds 2006/07



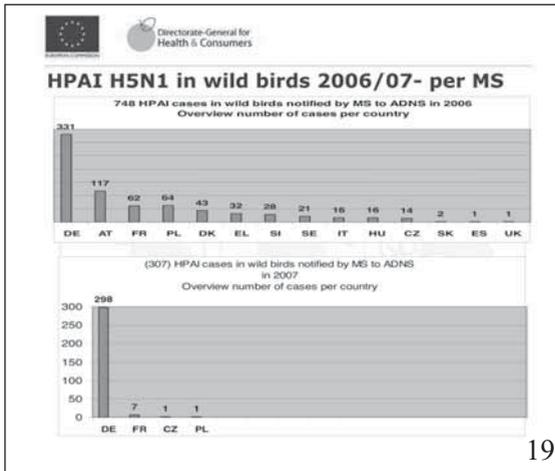
17



HPAI H5N1 in wild birds 2006/07 –affected species



18



Directorate-General for Health & Consumers

H5N1 in wild birds in 2008/09

2008

- United Kingdom: 11 wild birds (10 swans, 1 goose) in Jan-Feb
- Switzerland: 1 healthy live trapped wild duck (*pochard*) mid Feb 2008

2009

- Germany: 1 shot healthy mallard tested positive in Bavaria in March



20

Directorate-General for Health & Consumers

AI surveillance in poultry and wild birds

- according to EU harmonised guidelines Decision 2007/268/EC
- Member States' programmes are co-financed (50%) by the Commission
- July 2005 - Dec 2006 ~ 2.9 M€
- 2007 ~ 2.5 M€
- 2008 ~ 4.0 M€
- 2009 ~ 4,5 M€ (Italy 550.000€)

21

Directorate-General for Health & Consumers

Surveillance in poultry holdings



- **Objective:** detection of the circulation of LPAI H5 and H7 subtypes by serological surveys
- **Risk based approach**
- **Risk factors:**
 - free range
 - species: ducks, geese, game birds, turkeys
 - long life span
 - location close to resting and mixing places for wild migratory waterfowl in particular when coming from areas with outbreaks in poultry/wild birds
 - trade patterns

22

Directorate-General for Health & Consumers

Surveillance in poultry holdings (2) points for review

- **frequency of testing** for different categories of poultry, at different risk (turkeys, free range, game birds..)
- requirements for **international trade** (day-old chicks, hatching eggs)
- **testing methods** e.g. re-introduce virological testing of ducks?

23

Directorate-General for Health & Consumers

Surveillance for AI in wild birds



- **HPAI H5N1** has changed the picture
- it is new that wild birds known as reservoir for all AI viruses play now a role in spreading HPAI H5N1 virus over long distances
- **dead wild bird surveillance** during 2006 provided in most cases early warning for subsequent poultry outbreaks
- 2007 link not that obvious
- 2008/09 very few findings unrelated to outbreaks in poultry

24



Surveillance for AI in wild birds (2)

- **high risk species** of migratory waterfowl
- 70% active and 30 passive surveillance
- **Number of birds sampled**
 - 150.000 (2006) >> 50.000 (2008)
- very few positives for HPAI H5N1 almost exclusively in dead birds
- we still do not know the carrier species!

25



Surveillance for AI

How much surveillance do we need?



- Objectives must be clearly defined
- Sustainability
- Value for risk manager
- Balance between disease control and science
- Co-operation with ornithologists for risk assessment

26



Vaccination against AI

- **emergency vaccination**
- **NEW: preventive vaccination**
 - long term measure based on outcome of a risk assessment concluding that certain areas of MS, husbandry systems or categories/species of poultry are at a specific risk for AI exposure
- nationally approved vaccines or
- Community approved vaccines (EMA): 4 inactivated are available (H5N2, H5N3, H5N6, H7N1)
- challenge is the availability of vaccines - easy and cheap to administer providing for rapid onset of immunity

27



Vaccination against AI (2)

- Member States must submit **vaccination plans** for formal Commission approval
- plan must describe: disease situation, risk factors, area, number of holdings/birds to be vaccinated, species, vaccine characteristics, envisaged duration
- plan must also describe the accompanying surveillance of vaccinated flocks according to **DIVA strategy**

28



Vaccination against AI (3)

- **In the EU there is currently no vaccination applied in poultry**
- France 2006 preventive plan for ducks/geese not confined
- Netherlands 2006-09 voluntary preventive plan for hobby flocks/outdoor layers
- Germany research orientated field study from 2006-2008
- Italy 6 month emergency plan (meat turkeys & layers) in response to LPAI H7N3 until end of March 2008
- Portugal emergency and then preventive plan against LPAI H5N2 of breeding mallards until mid 2009
- Limited vaccination in zoo birds

29



Vaccination in Portugal



30



Compartmentalisation

- Regulation (EC) No 616/2009 of 13 July 2009 on the approval of poultry compartments with respect to avian influenza and additional biosecurity measures
- applicable as of 1 October 2009

31



Compartmentalisation (2)

- Definition in Directive 2005/94/EC:
 - **'poultry compartment'**
 - means a holding or holdings under a common biosecurity management system containing a poultry or other captive birds sub-population with a distinct health status with respect to avian influenza subjected to appropriate surveillance, control and biosecurity measures

32



Compartmentalisation (3)

- Compartment approval
- Responsibilities of the compartment manager/the industry
- 'Biosecurity plan' for the establishment
 - HACCP principle
 - traceability
 - cleaning /disinfection
 - feed, water supply
 - pest control
 - register for visitors
 - personnel hygiene
- 'Common biosecurity management plan' for all establishments of one compartment

33



Compartmentalisation (4)

- Specific AI surveillance
 - 20 serological samples
 - 2x/year in "peace time"
 - 4x/year when outbreak in the same Member State
 - every 21 days when compartment in restricted area

34



Compartmentalisation (5)

- regular internal and external audits
- corrective actions
- withdrawal of approval when continued non compliance or when an AI/ND outbreak occurs



35



Compartmentalisation (6)

- currently only applicable for **high biosecurity holdings** (breeders and hatcheries)
- currently only for **EU internal market** (and exports) - later for imports
- **mutual trust** between industry and veterinary authorities
- **challenge to implement it practically**

36



Intra-Community trade and imports

- **approval of hatcheries and breeding/production establishments**
 - hygiene requirements
 - disease surveillance programmes for *Salmonella Pullorum* and *Gallinarum*, *Salmonella arizonae*
 - *Mycoplasma gallisepticum* and *M. meleagridis*
- Imports – same requirements
- **AI surveillance plans** for live poultry and hatching egg imports as of 1.1.2008 third countries had to submit their plans
 - imports can actually only take place from parts of Brazil, Canada, Croatia, Chile, Israel, Switzerland and USA

37



Import restrictions

- **import bans** from third countries where HPAI H5N1 still present or an outbreak of HPAI occurs
- **heat treatment of meat**
 - either sterilised, hermetically sealed cans
 - 70°C throughout the product
- revised import and **quarantine rules for captive birds**
- permanent restrictions on imports for **unprocessed feathers**



38



EFSA - European Food Safety Authority

- **EU Legislation must be science based**
- Animal health and animal welfare aspects of AI (2005)
- Role of migratory birds in the spread of AI (2006)
- Risk with imports of captive birds into the EU (2006)
- AI vaccination in poultry and zoo birds (2008)
- Summary and update on AI (2009)
- Newcastle disease and vaccination (2008)
- <http://www.efsa.europa.eu/cs/Satellite>

39



Conclusions on AI

- There exists a generally **high level of disease awareness** and preparedness in EU Member States.
- The measures taken have so far **successfully reduced the impact of the disease** on animal and public health.
- **No serious sickness or fatality in humans has been reported!**
- **Flexible legislation** allows adapting the measures to specific and evolving disease situations based on risk assessment.

40



Conclusions (2)

- Avian influenza outbreaks will continue to occur.
- There are still **knowledge gaps** to fill.
- A **better understanding of the epidemiology** of the virus and improved tools for disease control are needed.
- **Better, safer and cheaper vaccines** which provide for a more rapid onset of immunity and can be easily applied, are needed.
- The **objectives for AI surveillance** have to be reviewed and refined, if appropriate.
- **Biosecurity measures** must be subject to continuous review and disease awareness must be kept high.

41



EU control measures for Newcastle Disease

- **Directive 92/66/EEC** on Community measures to control Newcastle disease is outdated
- **Defintion** to be aligned with OIE
- **testing methods** do not include PCR
- **not enough flexibility** for derogations from killing or for authorised movements from restricted areas based on risk assessment



42



EU control measures for Newcastle Disease (2)

- Practical problems
- outbreaks in backyard flocks because of insufficient vaccination coverage (BG, RO)
- ongoing pigeon epizootic (e.g. currently in BE, NL) – occasionally spill over to poultry
- pigeon keepers only vaccinate birds which participate in races and not all birds present on a holding
- update of legislation foreseen in the frame of the Community Animal Health Strategy

43



Community Animal Health Strategy (2007-2013)

- outcome of an external evaluation (2005-2006) of Community Animal Health policy
- available: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/strategy/archives/final_report_en.htm

44



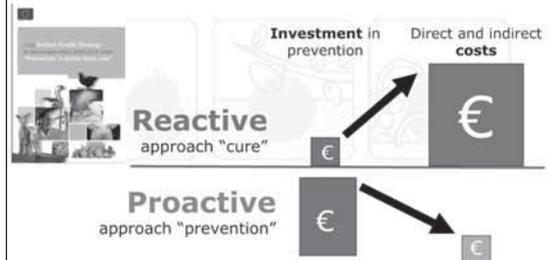
Outcome of evaluation

- lack of clear and transparent strategy
- no good communication strategy
- little stakeholder engagement and involvement in decision-making
- need to focus on prevention
- cost and responsibility sharing
- prioritisation of intervention

45



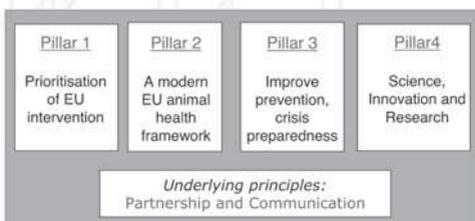
“Prevention is better than cure”



46



Action Plan for the Community Animal Health Strategy



47



Community Animal Health Strategy

- First pillar: **Prioritisation of intervention**
- OIE study on characterisation of diseases taking into account:
 - epidemiology of the disease
 - regional relevance
 - impacts on economy, public health and society

48



Community Animal Health Strategy

- Second pillar:
- **Community Animal Health Law**
 - online stakeholder consultation to be opened soon
 - http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/strategy/index_en.htm
- public private partnerships
- financing models including insurance schemes

49



Community Animal Health Strategy

- Third pillar: **Prevention and preparedness**
- Current **ADNS - Animal Disease Notification System** - for notification of diseases to be replaced by
- **ADIS - Animal Disease Information System** - improved data collection and reporting aligned with OIE

50



Community Animal Health Strategy

- **Task Force on Animal Disease surveillance** - TFADS group of experts on epidemiology
 - already consulted on WNF, BT, H1N1, AI, fish diseases
- **Task force on Vaccine Bank**
 - evaluates need for a Community vaccine bank for emergency vaccination

51



Climate change



- President Barroso "Climate Change must be integrated into all Community Policies".
- Some projections say that the demand for animal protein (meat, milk and eggs) will increase by 2020 by 50% in particular in developing countries

52



Climate change



- changes to vector and wildlife habitats increase contacts between wildlife, humans and domestic animals
- human behaviour, globalisation, trade, travelling, immigration, bush meat smuggle also contribute to emergence and or spread of diseases
- capacity building, enhanced surveillance and strengthening of laboratory networks necessary
- Commission's White paper on adaptation to climate change (1 April 2009) and accompanying document on human, animal and plant health
- http://ec.europa.eu/health/ph_threats/climate/climate_en.htm

53



Pandemic (H1N1) 2009 influenza



- no legal obligation for notification and control measures in the EU
- detection in turkeys in Chile and Canada
 - Commission guidance documents on surveillance/monitoring and control measures in pigs and poultry
 - **proportionality, flexibility and sustainability**



54



Pandemic (H1N1) 2009 influenza (2)

- passive surveillance system and investigations into suspicion of AI should lead to detection of pandemic (H1N1) 2009
- no inclusion into current active AI surveillance in poultry
- risk based monitoring approach with epidemiological link to infected humans

55



56

Pandemic (H1N1) 2009 influenza (3)

- biosecurity to protect poultry from infection by humans
- movement restrictions in a sustainable manner
- poultry may go to slaughter under normal hygiene rules
- no culling!!!
- **no food borne zoonoses OIE/FAO/WHO**



Veterinary week



- Animals and humans = One Health
- Conference on 30 October 2009: "Influenza at the human and animal interface"
- Registration closes by midnight 23 October 2009:
http://ec.europa.eu/health/conference/influenza_en.htm

57



Veterinary week (2)



- influenza at the human animal interface – "One flu"
- holistic approach – "think outside the box"
- veterinarians and human doctors to work together
- data sharing

58



One World = One Health (2)

- **Global strategy for preventing and managing risks at the human animal interface**
- disease control at the domestic and wild animal source must be tackled by public and private veterinary services
- **prediction, prevention and response**
- horizontal approach investment during peacetime

60



One World = One Health (OWOH)

- Some facts:
- 60% of human diseases are zoonotic
- 75% of emerging diseases are zoonotic
- 80% agents with potential use for bioterrorism are zoonotic

Concept brought up by Wildlife Conservation Society OIE, WHO, FAO and the EU in the European context embrace this concept and move forward

59



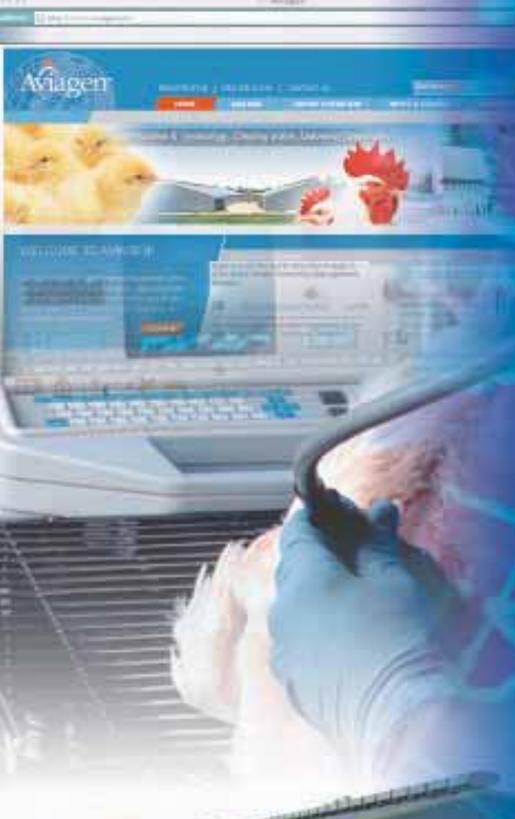
Thank you for your attention



61

GAETANA FERRI

**Ruolo del Governo Centrale per la gestione
ed il controllo delle malattie aviari**



Aviagen™

**Aviagen é il leader
mondiale nella
selezione di razze
per polli da carne**

**Innovazione e tecnologia
consentono ad Aviagen di offrire al
mercato mondiale una gamma di
prodotti competitivi che aggiungono
valore alle aziende dei nostri clienti.**

Aviagen™
Italia

**Via Marconi 15
27043 Broni (PV)
Italy**

**Tel: 0385 569 986
Fax: 0385 256 866
info@aviagen.com**

www.aviagen.com

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

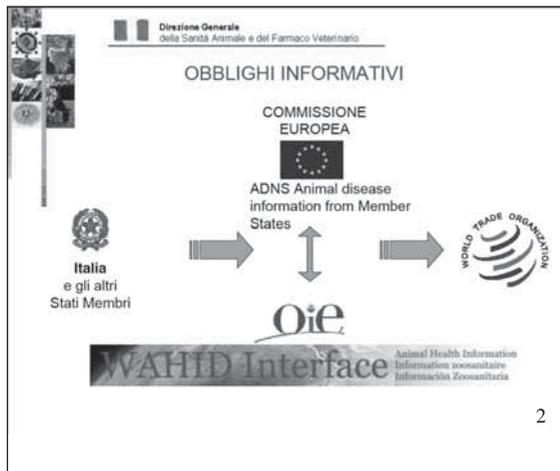
Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali

Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti

Ruolo del Governo Centrale per la gestione ed il controllo delle malattie aviari

Direttore Generale Dott.ssa Gaetana Ferri

Perugia, 23 Ottobre 2009



Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

oie

Office International des Epizooties
Organizzazione Mondiale della Sanità Animale
Nata nel 1924 a Parigi
162 Paesi Membri

America: 28 - Africa: 47 - Europa: 49 - Medio Oriente: 12 - Asia Occidentale: 26

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

oie

Compiti:

- assicurare la trasparenza della situazione epidemiologica di malattie animali e zoonosi
- analisi dei dati scientifici e comunicazione delle informazioni
- fornire consulenza e promuovere l'armonizzazione dei controlli internazionali

↓

Le disposizioni dell'O.I.E. rappresentano gli standards internazionali sui cui il WTO regola il commercio internazionale di animali vivi e prodotti nell'ambito dell'accordo per l'applicazione delle misure sanitarie e fitosanitarie (SPS Agreement)

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

oie

Classificazione delle malattie

Vecchia classificazione	Dal 2005 Nuova classificazione	<ul style="list-style-type: none"> • prima insorgenza di malattia o nuovo ceppo • Un improvviso aumento di mortalità a causa di una delle malattie della lista • cambiamenti nell'epidemiologia della malattia sul territorio • malattia emergente
Lista A Malattie con notifica entro 24 ore (es. Influenza aviaria Malattia di newcastle)	Lista unica Procedura di allerta	
Lista B Malattie con rapporto annuale	Rapporti semestrali e annuali	<ul style="list-style-type: none"> • situazioni endemiche

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Con la creazione del Mercato Unico Europeo (1 gennaio 1993) i controlli veterinari sui prodotti di origine animale e sugli animali vivi, effettuati a tutela della salute pubblica e della sanità animale, sono svolti dall'Autorità dello Stato di produzione ed immissione in commercio del prodotto o degli animali.



Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Garanzie fornite dal Paese comunitario speditore

- Certificazione
- Identificazione e Registrazione
- Tracciabilità

8

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Misure supplementari

In caso di rischio (come avvenuto, ad esempio con le emergenze sanitarie dovute a BSE e Blutongue), gli Stati membri possono adottare misure temporanee di salvaguardia a tutela della salute pubblica e/o degli animali, in attesa di eventuali misure armonizzate in sede comunitaria.

9

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Stati Membri

Compiti:

- Notifica dei focolai (Direttiva CEE 82/894 recepita in Italia con O.M. 6 OTTOBRE 1984 e Nota del ministro della sanità 14 gennaio 1999 n.600.6124461ag/92)

Ogni Stato membro notifica direttamente alla Commissione e a ciascuno degli altri Stati membri, entro 24 ore:

- l'insorgenza nel proprio territorio del focolaio primario di una delle malattie elencate nell'allegato I,
- la revoca — dopo l'estinzione dell'ultimo focolaio — delle restrizioni introdotte nel suo territorio in seguito alla comparsa di una delle malattie elencate nell'allegato I.

10

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Direttiva CEE 82/894 (modifica del 01/08/2008)
ALLEGATO I
Malattie per cui è necessaria la notifica
A. Malattie che colpiscono gli animali terrestri

Peste equina	Anemia infettiva equina
Peste suina africana	Alta epizootica
Influenza aviaria	Morva
Malattia di Newcastle	Dermatite nodulare contagiosa
Febbre catarrale ovina	Peste dei piccoli ruminanti
Encefalopatia spongiforme bovina	Febbre della Valle del Rift
Peste suina classica	Peste bovina
Pleuropolmonite contagiosa dei bovini	Vaiolo degli ovicaprini
Durina	Piccolo scarabeo dell'alveare (<i>Aethina tumida</i>)
Encefalomielite equina (tutte le forme, compresa l'encefalomielite equina venezuelana)	Malattia vescicolare dei suini <i>Tropilaelaps</i> mite
	Stomatite vescicolosa

11

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

COMMISSIONE EUROPEA

La Commissione si avvale dello Standing Committee on the Food Chain and Animal Health (SCoFAH)
Section : ANIMAL HEALTH & ANIMAL WELFARE

Funzioni:

- Si riunisce ogni mese oppure in seguito a situazioni di emergenza
- Presentazione agli stati membri della situazione relativa all'andamento di una determinata malattia infettiva sul proprio territorio

12

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

COMMISSIONE EUROPEA

COMMISSIONE EUROPEA ↔ SCofCAH

La Commissione ha la facoltà di proporre "Decisioni" riguardanti:

- Restrizione al commercio di animali e prodotti
- Misure sanitarie di controllo supplementari

LA PROPOSTA VIENE VOTATA DAGLI STATI MEMBRI A MAGGIORANZA QUALIFICATA LA DECISIONE PRESA E' VINCOLANTE

13

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Focolaio HPAI virus H7N7 in Spagna



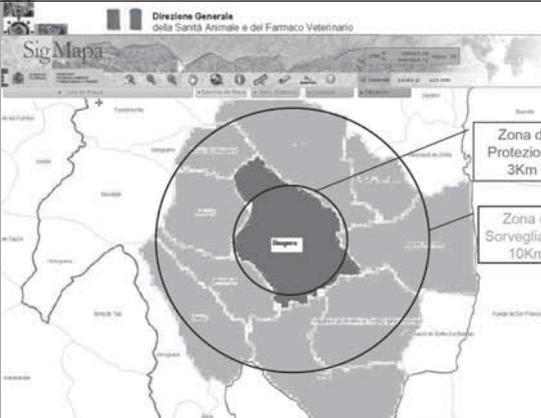
Allevamento infetto:

- (9 ottobre c.a.) Sospetto infezione in 2 dei 5 capannoni con un tasso di mortalità del 4% e 50% rispettivamente
- (11 ottobre c.a.) Conferma infezione HPAI virus A sottotipo H7

14

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

SigMapa



Zona di Protezione 3Km

Zona di Sorveglianza 10Km

15

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Focolaio HPAI virus H7N7 in Spagna

In accordo con la Direttiva CE 2005/94, oltre alla predetta individuazione della zona di restrizione, le Autorità spagnole hanno attuato le seguenti misure:

- stamping out degli allevamenti coinvolti
- divieto di movimentazione in tutti gli allevamenti posti nella zona di restrizione
- notifica alla Commissione Europea e all'OIE
- Aumento dei livelli di monitoraggio e sorveglianza sia clinica che analitica

La Commissione Europea, sentito il parere Scofcah, ha imposto il divieto di esportare verso Paesi Membri e Terzi pollame vivo, uova pronte per la deposizione, uova da cova e pulcini di un giorno provenienti da allevamenti siti nella zona di restrizione spagnola

16

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

TRACES
TRAde Control and Expert System

Per mezzo del Sistema Informativo Traces gli altri Paesi Membri possono effettuare il rintraccio delle partite di animali introdotte nei periodi precedenti la notifica dei focolai al fine di monitorare gli animali che eventualmente potrebbero risultare contagiati.

17

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Autorità centrale italiana
Compiti

La Modifica del Titolo V della Costituzione (legge costituzionale n. 3/2001, che ha modificato l'articolo 117 della Costituzione) ha determinato

in capo allo Stato centrale

- La competenza esclusiva in materia di dogane, protezione dei confini nazionali e profilassi internazionale
- La competenza esclusiva nella definizione dei Livelli Essenziali delle prestazioni di Assistenza sanitaria (LEA)
- La fissazione di norme di principio sulla tutela della salute (organizzazione e assistenza sanitaria)

in capo alle Regioni

- La tutela della salute (organizzazione e assistenza sanitaria)

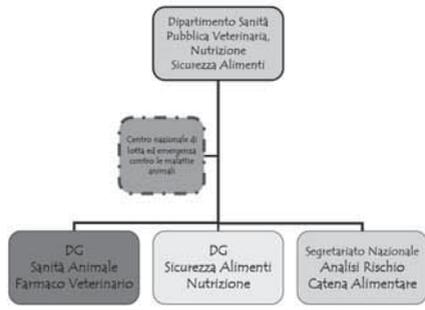
18


Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario
Autorità centrale italiana
Assetto organizzativo
LEGGE 30 NOVEMBRE 2005, N. 244

- Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 1° ottobre 2005, n. 202, recante misure urgenti per la prevenzione dell'influenza aviaria

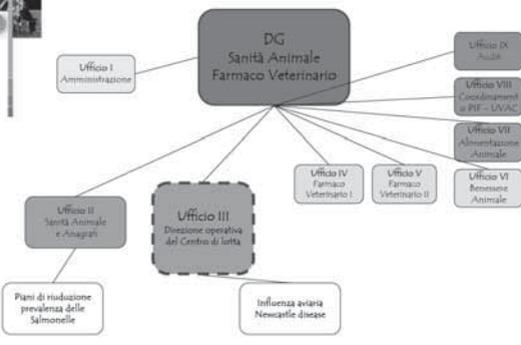
19


Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario
Autorità Veterinaria centrale



20


Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario
struttura DG Sanità Animale e Farmaco Veterinario

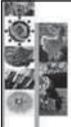


21


Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario
Autorità centrale italiana
Assetto organizzativo
LEGGE 30 NOVEMBRE 2005, N. 244
PREVENZIONE E LOTTA CONTRO L'INFLUENZA AVIARIA, LE MALATTIE DEGLI ANIMALI E LE RELATIVE EMERGENZE
ARTICOLO 1

- "... è istituito presso la Direzione generale della sanità veterinaria e degli alimenti del Ministero della salute, il Centro nazionale di lotta ed emergenza contro le malattie animali ..."
-
- "È istituito presso il Ministero della salute il Dipartimento per la sanità pubblica veterinaria, la nutrizione e la sicurezza degli alimenti, articolato in tre uffici di livello dirigenziale generale ..."

22


Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario
LEGGE 30 NOVEMBRE 2005, N. 244
Centro nazionale di lotta ed emergenza contro le malattie animali: Finalità

- Potenziare e razionalizzare gli strumenti di lotta contro
 - influenza aviaria
 - malattie animali
 - emergenze zoo-sanitarie
- Incrementare le attività di
 - prevenzione
 - profilassi internazionale
 - controllo sanitario

23


Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario
LEGGE 30 NOVEMBRE 2005, N. 244
Centro nazionale di lotta ed emergenza contro le malattie animali: Finalità

In particolare:

il Centro deve assicurare un alto livello di tutela della salute degli animali nonché il coordinamento e l'uniforme applicazione, sull'intero territorio nazionale degli interventi, delle attività e delle misure inerenti alla sanità animale, anche per le finalità di **profilassi internazionale**, nel rispetto degli obblighi posti dalla normativa comunitaria e del Codice zoo-sanitario dell'OIE.

24

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

LEGGE 30 NOVEMBRE 2005, N. 244

Unità Centrale di Crisi

Funzioni:

- Adozione di misure di polizia veterinaria
- Controllo sieri vaccini e antigeni
- Coordinamento Unità di Crisi Regionale e Locale
- Misure straordinarie (abbattimento capi aziende a rischio)
- Verifica dell'attuazione e applicazione delle misure sul territorio
- Gestione con i Centri di riferimento delle informazioni per il controllo emergenze

25

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Sorveglianza epidemiologica e strategia d'intervento per il controllo e l'eradicazione dell'influenza aviaria in Italia

- Linee guida del Ministero (emanate il 24 ott 2005)
- Piano di monitoraggio nazionale 2009 (trasmesso annualmente alla Commissione)
- Manuale di emergenza
- Piano di vaccinazione di emergenza

26

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

PIANO DI MONITORAGGIO 2009

- **VOLATILI DOMESTICI** → Piano Nazionale Monitoraggio
- **AVIFAUNA SELVATICA** → Linee guida comunitarie:
 - 1) Sorveglianza attiva su volatili vivi o cacciati
 - 2) Sorveglianza passiva su selvatici trovati morti
- INFS E CRN I.A.
 - DOVE** → Zone umide territorio nazionale, periodo autunno-inverno
 - COME** → Tamponi cloacali da: 80% anatidi, 10% limicoli, 10% altri

27

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Focolai LPAI virus in Italia anno 2009 aggiornamento 26 giugno 2009

13 focolai LPAI notificati alla Commissione Europea

- 4 focolai LPAI (H5N7) In Veneto e Lombardia
- 2 focolai LPAI (H7N3) and 7 (H7) LPAI in Umbria, Piemonte, Emilia Romagna and Veneto

Fonte: CREV

28

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Coinvolgimento successivo degli allevamenti rurali

Dal 29/06/09 al 21/08/09 sono state riscontrate infezioni da LPAI virus (H7) in 3 commercianti e 14 allevamenti rurali situati in 5 diverse Regioni

Fonte: CREV

29

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Nota prot 2188 del 6 febbraio 2009

Indicazioni operative per la gestione delle sieropositività nelle regioni Calabria, Basilicata e Campania.

.....l'allevamento "free range" garantisce da una parte un miglior benessere animale
ma
rappresentano la tipologia di allevamento il cui rischio di introduzione di virus influenzale è più alto.

ANIMALI ALLEVATI

↔

SERBATOIO NATURALE DI INFEZIONE

30

Direzione Generale
della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Attività di coordinamento a livello centrale

Sulla base di queste evidenze, il Centro di lotta di concerto con la DGSAFV ha istituito un gruppo di lavoro preliminare con le Regioni più interessate al fine di valutare i fattori di rischio legati alla diffusione e alla circolazione dei virus LPAI negli allevamenti rurali

Obiettivi:

- Individuazione dei fattori di rischio (svezatori)
- Norme di biosicurezza utili all'attenuazione del rischio
- Controlli
- Movimentazione e anagrafe dei volatili
- Successiva condivisione degli obiettivi con le altre parti interessate (Stakeholder)

31

Direzione Generale
della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Piani di riduzione della prevalenza di *Salmonella spp*



32

Direzione Generale
della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Attuazione delle norme Europee

- Direttiva zoonosi 2003/99/CEE, recepita in Italia con D.L.vo 191/06,
- Regolamento comunitario 2160/2003, di applicazione della Direttiva 2003/99, e successive integrazioni e modifiche

33

Direzione Generale
della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Attuazione delle norme Europee

- Il regolamento comunitario 2160/2003 indica, nell'allegato I, tutti i sierotipi di salmonella rilevanti per la sanità pubblica per i quali devono essere fissati obiettivi comunitari di riduzione della prevalenza.
- l'obiettivo comunitario viene fissato sulla base dei dati prodotti da un baseline study.
- Tale obiettivo, dopo l'applicazione di un piano triennale specifico, viene rivisto.

34

Direzione Generale
della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Risultati dei Baseline Studies attuati in Italia

- Riproduttori, è l'unica categoria di pollame per cui la Commissione ha ritenuto esauritivi i dati ottenuti tramite la precedente Direttiva zoonosi, senza necessità di un baseline study. L'obiettivo comunitario è di ridurre all'1% entro il 31 dicembre 2009 la percentuale massima di prevalenza di infezione da Salmonella Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis e Hadar. Sulla base dei risultati raggiunti verrà modulato un nuovo obiettivo.
- Ovaiole, piano triennale 2008 – 2010. L'Italia parte da una positività del 7,9% distribuita tra due sierotipi (Enteritidis 4,1% e Typhimurium 3,8%). Poiché tale percentuale ci colloca nella fascia più bassa, la percentuale minima annua di riduzione dei gruppi positivi dev'essere del 10%.
- Broiler, piano triennale 2009 – 2011, con l'obiettivo comunitario di ridurre la prevalenza di Salmonella Enteritidis e Typhimurium all'1% o meno. In Italia la prevalenza di Salmonella Enteritidis e Typhimurium stimata sulla base dei baseline study è risultata pari al 2,3%.

35

Direzione Generale
della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Zoonosi ed agenti zoonotici per i quali devono essere fissati obiettivi comunitari di riduzione della prevalenza ai sensi dell'articolo 4

1. Zoonosi o agente zoonotico	2. Popolazione animale	3. Sierotipo della carne alimentare	4. Data entro la quale deve essere fissato l'obiettivo (%)	5. Data a decorrere dalla quale devono essere ultimati le prove
Tutti i sierotipi di Salmonella rilevanti per la sanità pubblica	Pollame da riproduzione della specie Gallus gallus	Produzione primaria	A 17 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento	A 18 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento
Tutti i sierotipi di Salmonella rilevanti per la sanità pubblica	Galline orovide	Produzione primaria	A 24 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento	A 18 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento
Tutti i sierotipi di Salmonella rilevanti per la sanità pubblica	Polli da carne	Produzione primaria	A 18 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento	A 18 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento
Tutti i sierotipi di Salmonella rilevanti per la sanità pubblica	Tacchini	Produzione primaria	A 48 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento	A 18 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento
Tutti i sierotipi di Salmonella rilevanti per la sanità pubblica	Suini destinati alla produzione di carne	Macellazione	A 48 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento	A 18 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento
Tutti i sierotipi di Salmonella rilevanti per la sanità pubblica	Suini da riproduzione	Produzione primaria	A 60 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento	A 18 mesi dalla data di entrata in vigore del presente regolamento

(*) I dati preesistenti che dati comparabili in materia di prevalenza saranno disponibili almeno 6 mesi prima della definizione dell'obiettivo, se i dati non sono fossero disponibili, la data per la definizione dell'obiettivo sarebbe conseguentemente differita.

36

Ruolo del Ministero

- Il Ministero, tramite piani nazionali approvati dalla Commissione Europea, applica sul proprio territorio le misure sanitarie previste.
- Tali piani sono cofinanziati al 50% dalla Commissione europea e ciascuno Stato Membro ha a disposizione un tetto massimo di spesa.

37

Ruolo del Ministero

- Il Ministero del Lavoro, della salute e delle politiche sociali, con la collaborazione del Centro di riferimento delle salmonellosi, prepara ogni anno i piani di controllo.
- Coordina le attività delle regioni allo scopo di un'efficace applicazione delle misure sanitarie previste.
- Emanando atti di gestione e indirizzo sul territorio, a seguito di un'attenta valutazione del rischio.
- **Soddisfa i debiti informativi con la Commissione a cui trasmette relazioni intermedie ed annuali.**

38

Piani di controllo per le salmonellosi:

1. Riproduttori *Gallus gallus*
per S. Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis, Hadar
 2. Ovaiole
per S. Enteritidis e Typhimurium
 3. Broilers
per S. Enteritidis e Typhimurium
- Dal 01 gennaio 2010 sarà operativo il piano di controllo per i tacchini (riproduttori e ingrasso)
per S. Enteritidis e Typhimurium

39

Sono stati predisposti degli appositi sistemi informativi (attualmente uno per ogni piano) per la registrazione dei dati raccolti ai sensi dei piani di controllo nazionali da parte delle Regioni.

- Affinchè la rendicontazione annuale alla Commissione ottenga i risultati attesi, è necessario che la fonte primaria del dato, cioè il servizio veterinario che compila le schede di campionamento, riporti correttamente e completamente nella scheda di prelievo dei campioni tutte le informazioni necessarie.
- Allo scopo di rendere più efficiente l'attività di rendicontazione è stato messo a disposizione il sistema informativo SANAN RENDICONTAZIONI in cui vengono assemblate sia le informazioni già registrate nei sistemi informativi dedicati sia altre informazioni estratte dalla BDN dell'Anagrafe Avicola implementata a seguito dell'emanazione dell'OM 26 agosto 2005.
- La raccolta dei dati, il loro inserimento e validazione nel sistema permette di soddisfare il debito informativo verso la UE.
- E' indispensabile un dato aggiornato sulla numerosità degli allevamenti ripartiti all'interno di classi di consistenza per ottenere risultati migliori.

40

- La puntuale ed efficace implementazione dei flussi informativi dei dati epidemiologici regionali è fondamentale al fine di una corretta gestione dell'analisi del rischio.
- Inoltre la mancata rendicontazione dei risultati ottenuti attraverso i piani di controllo determina una penalizzazione economica da parte della UE nei confronti dell'Italia, in quanto non c'è il riscontro dell'attività effettivamente svolta sul territorio.

41

Ultime disposizioni in materia: nota DGSA del 10 sett. 2009

- I piani di sorveglianza e controllo si articolano su base triennale, per raggiungere gradatamente l'obiettivo.
- Recentemente è stato registrato un peggioramento della situazione epidemiologica legata all'aumento della prevalenza delle salmonelle nel pollame, anziché un avvicinamento al target richiesto dall'obiettivo comunitario.
- Inoltre, si segnala una carenza di informazioni anagrafiche ed un peggioramento della qualità dei dati stessi.
- Infatti è aumentata la discrepanza tra il numero dei gruppi controllabili e quelli effettivamente controllati.
- E' quindi necessario un maggior rispetto dei piani con:
 - esecuzione puntuale dei controlli previsti con sollecita registrazione degli stessi negli appositi sistemi informativi (compresi gli esiti degli autocontrolli)
 - scrupolosa applicazione di tutte le misure sanitarie previste in caso di positività
 - aggiornamento dell'anagrafe degli allevamenti e delle aziende avicole nella BDN dell'anagrafe zootecnica.

42

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

L'approccio dettato dalla nuova Strategia Comunitaria (2007-2013) per la Sanità Animale è:
"Prevenire è meglio che curare"

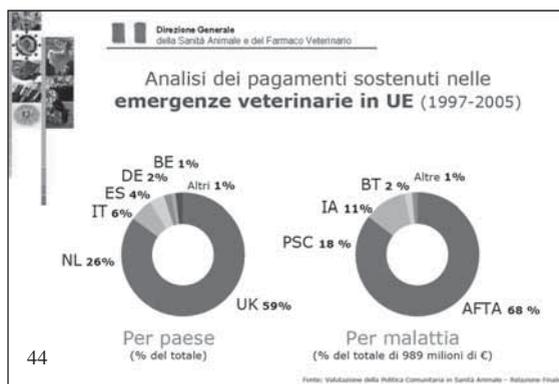
Investimento in prevenzione **Costi diretti ed indiretti**

approccio reattivo "curare" € → €

approccio proattivo "prevenire" € → €

Fonte: Valutazione della Politica Comunitaria in Sanità Animale - Edizione Finale

43



Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Analisi dei pagamenti sostenuti nelle emergenze veterinarie in UE (1997-2005)

L'influenza aviaria è tra le patologie con il più alto impatto economico per la gestione e il controllo della sanità animale

45

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

La nuova strategia per la salute degli animali nella UE 2007-2013

- Pilastro 1- Definizione delle priorità di intervento
- Pilastro 2- Nuovo quadro normativo per la salute animale
- Pilastro 3- Prevenzione, controllo e capacità di gestire le emergenze
- Pilastro 4- Scienza innovazione e ricerca European Technology Platform for Global Animal Health (ETPGAH)

46

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Nuova Animal Health Law

Norma orizzontale che fissa i principi fondamentali per la gestione dei rischi legati alla sanità animale

- Responsabilità degli operatori
- Elevati livelli di biosicurezza
- Implementazione armonizzata ed interoperabilità dei sistemi informativi comunitari

47

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Priorità d'intervento

- Individuare la rilevanza delle minacce in funzione dei 4 obiettivi della strategia
- Settare il livello di rischio accettabile
- Individuare le azioni che saranno prioritarie per il futuro
- Necessità di mettere a punto uno strumento:
 - A) Trasparente e condiviso da tutti gli attori (autorità sanitarie, produttori etc)
 - B) Fondato su presupposti scientifici per la quantificazione del rischio
- Messa a punto di un sistema a griglia in grado di quantificare per ogni singola malattia 3 aspetti generali
 - Il suo livello di rischio
 - Le capacità di controllarlo
 - Il potenziale impatto della minaccia

48

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario

Dott.ssa Gaetana Ferri

Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco veterinario

Contatti: 06.5994.6584 sanita.animale@sanita.it

Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali

Grazie per l'attenzione

49

ATTI DEL XLIX CONVEGNO ANNUALE

INCONTRO

**Le principali tematiche di carattere sanitario
che hanno caratterizzato l'ultimo scorcio
del 2009 e l'inizio del 2010**

Forlì, 29-30 Aprile 2010

NOVITÀ



La soluzione che salva l'uovo e la gallina.

Da Bayer il primo farmaco veterinario autorizzato contro il "pidocchio rosso"

È una novità Bayer.



Bayer HealthCare
Animal Health

ATTIVITÀ DEL CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LE SALMONELLOSI NEL 2009-2010

Veronica Cibin & Antonia Ricci

Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD).

Il Regolamento CE n.2160/2003, “sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti” rappresenta il Regolamento di riferimento rispetto all’applicazione di piani di controllo, a livello di produzione primaria, mirati all’ottenimento di una riduzione graduale della prevalenza di sierotipi di salmonella rilevanti per la salute pubblica.

L’allegato I del Regolamento CE n.2160/2003 specifica tempi e modi per la definizione degli obiettivi di riduzione oltre che le categorie produttive interessate. Successivamente al Regolamento CE n.2160/2003 sono stati pubblicati i Regolamenti specifici per ciascuna categoria produttiva indicata nella tabella dell’Allegato I, nei quali venivano definiti di volta in volta gli obiettivi di riduzione previsti ed i sierotipi rilevanti.

A partire dal 2007, in ottemperanza a quanto previsto dall’allegato I e dai Regolamenti specifici, sono stati attivati, anche in Italia, piani nazionali di durata triennale che hanno interessato di anno in anno le seguenti categorie produttive: riproduttori *Gallus gallus* nel 2007 (riferimento normativo Regolamento CE n.1003/2005), galline ovaiole nel 2008 (riferimento normativo Regolamento CE n.1168/2006), polli da carne nel 2009 (riferimento normativo Regolamento CE n.646/2007).

I piani di controllo nazionali sono stati di anno in anno approvati dalla Commissione Europea che ha provveduto a stanziare dei cofinanziamenti sulla base delle previsioni di spesa identificate da ciascun Paese Membro.

A completezza del quadro normativo sono inoltre stati emanati dei Regolamenti a valenza trasversale, il Regolamento CE n.1091/2005 e il Regolamento CE n. 1177/2006 per quanto riguarda l’impiego di metodi di controllo nell’ambito dei piani nazionali che hanno in particolare chiarito aspetti relativi all’uso degli antibiotici e dei vaccini.

A livello nazionale aspetti critici o poco chiari dei piani di controllo nazionale emersi in seguito alla loro applicazione sono stati chiariti attraverso note ministeriali.

Nel 2009 sono stati trasmessi alla Commissione Europea per approvazione i piani di controllo per l’anno 2010. In particolare sono stati trasmessi: il nuovo piano di controllo triennale (2010-2012) relativamente ai riproduttori *Gallus gallus* ed il piano di controllo di *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium nei tacchini da riproduzione e da ingrasso; per quanto riguarda le galline ovaiole ed i polli da carne i piani trasmessi sono stati modificati sostanzialmente per quanto riguarda alcuni aspetti. In generale nella stesura dei piani di controllo per il 2010 sono stati considerati oltre che i vincoli imposti dai Regolamenti comunitari, anche le criticità emerse nel corso dei precedenti anni di applicazione e le modifiche richieste e già approvate dalla Commissione.

I piani di controllo solo stati approvati e cofinanziati per il 2010 con Decisione della Commissione 2009/883 del 26 novembre 2009, ed è previsto per l'Italia un contributo finanziario pari a EUR 1.250.000.

Di seguito vengono descritti gli aspetti principali del piano di controllo dei tacchini da riproduzione e da ingrasso, che rappresenta una assoluta novità e che ai sensi dell'allegato I del Regolamento CE n.2160/2003 consente di concludere il percorso delineato relativamente alla filiera avicola, i punti salienti del nuovo piano triennale per i riproduttori *Gallus gallus* e le modifiche sostanziali dei piani relativi alle galline ovaiole ed ai polli da carne.

Sulla base dei risultati dello studio relativo alla valutazione della prevalenza di *Salmonella* spp. in gruppi di tacchini da ingrasso e da riproduzione effettuato tra ottobre 2006 e novembre 2007 in ottemperanza alla Decisione 2006/662/CE sono stati stabiliti obiettivi comunitari di riduzione della prevalenza (Regolamento CE n. 584/2008) per queste categorie produttive.

L'obiettivo comunitario è di ridurre la prevalenza di infezione da *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium nei gruppi di tacchini da ingrasso e da riproduzione all'1% nel corso dei tre anni di applicazione (2010-2012) in accordo a quanto stabilito dal Regolamento CE n.584/2008.

Il piano si basa sull'effettuazione di controlli sia su iniziativa dell'allevatore (autocontrollo) sia su controlli ufficiali; in particolare per quanto riguarda i controlli ufficiali è previsto che questi vengano effettuati solo in una selezione di aziende. Nel caso in cui vengano identificate salmonelle rilevanti in gruppi di tacchini da ingrasso, a seguito dei controlli effettuati su iniziativa dell'allevatore, non è prevista l'effettuazione di un campionamento ufficiale di conferma; nel caso in cui invece salmonelle rilevanti vengano identificate in gruppi di riproduttori a seguito di autocontrollo l'Autorità competente dovrà provvedere ad applicare i controlli necessari per confermare l'isolamento (con le stesse modalità previste per il campionamento ufficiale di routine). Per quanto riguarda i tacchini riproduttori, in caso di isolamento di *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium* a seguito di un campionamento in autocontrollo (ad esclusione del campionamento effettuato a fine ciclo) o a seguito di campionamento ufficiale di routine, può essere eseguito in circostanze eccezionali un campionamento ufficiale di conferma, nel caso in cui l'Autorità Competente abbia ragioni per dubitare del risultato dell'analisi (sospetto di risultati falsamente positivi o falsamente negativi). Le misure sanitarie previste in caso di positività per sierotipi rilevanti sono mirate a impedire e/o limitare la diffusione delle salmonelle; è prevista la possibilità di destinare gli animali alla macellazione ed in questo caso tutta la carne ottenuta dal gruppo positivo deve essere trattata termicamente prima di ulteriori trasformazioni a meno di esito negativo della ricerca di *Salmonella* spp. nel muscolo di 15 animali per capannone.

Per quanto riguarda i riproduttori della specie *Gallus gallus* con Regolamento CE n.213/2009 la Commissione Europea stabilisce che non è necessario modificare l'obiettivo comunitario di riduzione della prevalenza già stabilito con Regolamento CE n.1003/2005; di conseguenza l'obiettivo da raggiungere entro il 2012 è una riduzione della prevalenza di infezione da *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* ed *S. Hadar* nei gruppi di riproduttori all'1%.

Il piano prevede l'effettuazione di campionamenti da eseguirsi in autocontrollo e da parte dell'Autorità competente presso l'allevamento; è previsto che l'Autorità competente provveda ad applicare i controlli necessari per confermare l'isolamento in caso vengano identificati sierotipi rilevanti in autocontrollo ed è inoltre prevista la possibilità di effettuare in circostanze eccezionali un campionamento ufficiale di conferma.

Per quanto riguarda le misure sanitarie da intraprendere in caso di positività non è prevista l'applicazione di misure restrittive in caso di isolamento di *S. Hadar*, *S. Infantis* e *S. Virchow*.

Rispetto al piano di controllo relativo alle galline ovaiole le principali modifiche sono le seguenti: introduzione di un campionamento in autocontrollo due settimane prima dell'entrata in deposizione; effettuazione del campionamento ufficiale in un gruppo per anno per azienda nelle aziende con più di 1000 capi indipendentemente dal fatto che siano o meno presenti animali prossimi alla macellazione; effettuazione di un campionamento ufficiale di conferma ai sensi del Regolamento CE n.1237/2007; possibilità per i gruppi positivi a sierotipi rilevanti che producono uova destinate alla pastorizzazione di essere macellati a fine ciclo.

Per quanto riguarda il piano di controllo polli da carne le modifiche sostanziali rispetto al 2009 sono quelle elencate di seguito: effettuazione del campionamento ufficiale in un gruppo per anno per azienda nel 10% delle aziende con più di 5000 capi; eliminazione del campionamento ufficiale di conferma e seguito di positività per sierotipi rilevanti in autocontrollo; possibilità di evitare il trattamento termico della carne a seguito di esito negativo della ricerca di *Salmonella* spp. nel muscolo di 15 animali per capannone.



Prodotti per la salute animale

CONVEGNO
Disinfezione, disinfestazione e
derattizzazione: anello fondamentale
della biosicurezza in avicoltura

DISINFEZIONE E DISINFESTAZIONE IN AVICOLTURA: ASPETTI LEGISLATIVI ED UTILIZZO DEI PRINCIPI ATTIVI.

Agostino Macri

Istituto Superiore di Sanità.

INTRODUZIONE

L'avicoltura è uno dei rari settori produttivi alimentari in cui il nostro Paese è autosufficiente grazie al grande sviluppo degli allevamenti intensivi che assicurano la quasi totalità della produzione italiana. Si deve comunque rilevare che da un punto di vista numerico gli allevamenti familiari sono prevalenti e che recentemente sono sorti gli allevamenti "biologici" che debbono seguire procedure in cui è proibito l'impiego di sostanze chimiche xenobiotiche per evitare ogni pericolo di "residui".

L'enorme sviluppo dell'avicoltura intensiva è dovuto, oltre che alla selezione genetica degli animali, lo sviluppo di tecniche alimentari sofisticati e criteri di stabulazione avanzati, soprattutto alla introduzione di misure di profilassi e di terapia altamente innovative che consentono di ridurre se non eliminare del tutto le malattie infettive negli animali. Di conseguenza le carni e le uova prodotte seguendo tali tecniche di allevamento sono praticamente prive di pericoli microbiologici.

Le stesse certezze "microbiologiche" non possono però essere assicurate dalle produzioni avicole tradizionali e da quelle biologiche in quanto gli animali vivono in un contesto ambientale in cui il pericolo del contatto con microrganismi patogeni è costante.

In ogni forma di allevamento è però necessario attuare misure di prevenzione della diffusione delle malattie infettive che debbono essere adattate di volta in volta ed in particolare la disinfezione e la disinfestazione vanno praticate in funzione delle specifiche esigenze.

In tale contesto bisogna anche tenere conto dell'opinione pubblica in cui si è fatto strada il convincimento che negli allevamenti intensivi gli animali vivano in condizioni di grande malessere e che, soprattutto, le carni e le uova prodotte siano particolarmente ricche di residui di sostanze chimiche incluse quelle ad attività ormonale. Esistono però delle normative nazionali e comunitarie sulla conduzione degli allevamenti il cui rispetto conferisce le massime garanzie di sicurezza ai consumatori sia da un punto di vista microbiologico che di assenza di contaminazioni chimiche pericolose.

DISINFEZIONE E DISINFESTAZIONE

Le malattie infettive ed infestive rappresentano il pericolo maggiore per il benessere e la salute degli animali, la sicurezza dei consumatori ed anche la redditività delle aziende zootecniche.

Le malattie si diffondono facilmente tra gli animali, ma il vero problema è quello di prevenire le contaminazioni "esterne" che possono provenire dall'intera filiera produttiva ed in particolare da:

- a) microrganismi o parassiti patogeni ambientali;
- b) microrganismi o parassiti patogeni "alimentari" (acqua e/o mangimi)
- c) invertebrati (insetti in particolare)
- d) vertebrati (animali sinantropi)
- e) persone ammalate.

La disinfezione e la disinfestazione, insieme ai divieti di movimentazione, all'isolamento ed alla distruzione degli animali ammalati, sono state da sempre le uniche tecniche di prevenzione per la diffusione delle malattie negli allevamenti. Queste tecniche sono molto efficaci, ma richiedono una preventiva analisi accurata dei rischi anche per evitare conseguenze negative sia di carattere sanitario che economico.

Prima di intervenire è quindi necessario individuare il “pericolo”, in quale punto della filiera è presente ed anche comprenderne la sua gravità; occorre poi trovare le modalità di intervento più efficaci per debellarlo, ovvero se è preferibile un trattamento fisico (lavaggio accurato, asportazione meccanica, incenerimento, ecc.) oppure uno chimico con sostanze “biocidi”. Vanno poi considerati i pericoli per gli animali, la sicurezza delle carni e/o delle uova, per l'ambiente ed i costi che debbono essere affrontati per i trattamenti. Il complesso delle informazioni disponibili consente una valutazione accurata dei rischi e dei benefici e quindi sarà possibile definire un protocollo di intervento che sia il più efficace e possibilmente il meno costoso.

Le situazioni di pericolo che possono verificarsi sono le più disparate e spesso richiedono un intervento coordinato tra i vari operatori della filiera. Uno dei principali problemi è rappresentato dalla qualità igienico sanitaria dei mangimi la cui contaminazione microbiologica può dare origine a pericolose malattie infettive anche a carattere zoonosico. Quella più preoccupante è probabilmente la salmonellosi e la sua origine alle volte è legata alle materie prime di importazione (soia e farine di pesce in particolare) che sia nei luoghi di origine che durante il trasporto via mare possono contaminarsi con microrganismi patogeni. La loro eventuale bonifica dovrebbe avvenire al momento dello sbarco; una sterilizzazione comporta dei costi non sempre sostenibili mentre potrebbe essere efficace il trattamento con sostanze chimiche antibatteriche. Se partite contaminate dovessero arrivare nei mangimifici potrebbero a loro volta contaminare i silos e gli impianti di miscelazione amplificando il rischio di contagio.

Un altro anello debole della filiera della produzione avicola riguarda il possibile contatto con animali sinantropi (roditori ed uccelli in particolare) che sono attratti dalla ampia disponibilità di cibo e soprattutto in quegli allevamenti in cui esistono aperture verso l'esterno. La lotta agli animali sinantropi è particolarmente complessa e, anche se sono disponibili i rodenticidi e mezzi di dissuasione per gli uccelli, la misura più efficace sembra essere l'isolamento totale degli allevamenti.

La comparsa di una malattia infettiva in un allevamento può dipendere dalle condizioni igieniche dei locali di stabulazione il cui mantenimento richiede periodiche disinfestazioni e disinfezioni che possono coincidere con il ricambio degli animali. In questi casi vengono impiegati preparati “biocidi” che in pratica “sterilizzano” gli ambienti rendendoli salubri per gli animali.

Le stesse misure di disinfezione e disinfestazione debbono essere praticate nei covatoi dove i problemi di residui nelle carni e nelle uova sono praticamente inesistenti e quindi i trattamenti possono essere più energici.

Esiste infine il problema della sicurezza “microbiologica” che deve essere mantenuta

nel momento della macellazione industriale degli animali. Negli Stati Uniti è consentito l'impiego di soluzioni di disinfettanti (acqua ossigenata, ipoclorito di sodio, polifosfati) sulle carcasse degli animali. Tale pratica non è consentita nella UE.

ASPETTI LEGISLATIVI.

I disinfettanti ed i disinfestanti che possono essere impiegati in avicoltura, appartenevano alla categoria dei “presidi medico-chirurgici”, ma la normativa europea, recepita dal nostro Paese, li ha inseriti con la Direttiva 98/8/CE nella nuova categoria di “biocidi”. I “biocidi” sono “I principi attivi ed i preparati contenenti uno o più principi attivi, presentati nella forma in cui sono consegnati all'utilizzatore, destinati a distruggere, eliminare, rendere innocui, impedire l'azione o esercitare altro effetto di controllo su qualsiasi organismo nocivo con mezzi chimici o biologici” (DL 25.2.2000 n° 174).

Possono essere utilizzati soltanto i prodotti registrati e per i quali è dimostrata la sicurezza e l'efficacia. Per quanto riguarda i prodotti di uso veterinario deve comunque essere esclusa qualsiasi attività terapeutica. Inoltre sono esclusi dalla registrazione i prodotti chimici altamente tossici, mutageni, cancerogeni e teratogeni.

I biocidi sono divisi nei seguenti quattro gruppi:

- a) Disinfettanti e biocidi in generale
- b) Preservanti (vengono impiegati per la conservazione del legno in particolare)
- c) Controllo degli animali nocivi
- d) Altri biocidi

I presidi medico-chirurgici che registrati in passato sono circa 19.000 ed è in atto una revisione al termine della quali i prodotti che superano la valutazione vengono trasferiti tra i biocidi. Si tratta di una procedura molto complessa che richiede molto tempo in quanto anche l'iter legislativo comunitaria non è stato ancora completato.

La procedura di revisione prevede anche controlli di conformità dei vari prodotti oltre che una valutazione della documentazione disponibile.

CONCLUSIONI.

La presenza di malattie infettive negli allevamenti avicoli comporta pericoli anche molto gravi e l'attuazione di corrette misure preventive è di fondamentale importanza.

Tali misure non debbono limitarsi alle sole strutture degli allevamenti, ma riguardare l'intera filiera produttiva evitando le contaminazioni il più a monte possibile.

Sono disponibili numerose tecniche di intervento e tra questa l'uso dei biocidi può risultare molto efficace.

E' però necessario agire con molta cautela rispettando le norme vigenti ed affidando la gestione degli interventi a personale esperto ed in grado di evitare i pericoli derivanti dalla manipolazione di sostanze chimiche.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

EPISODIO DI BOTULISMO IN POLLI DA CARNE: RILIEVI DIAGNOSTICI

Bano L. ¹, Giovanardi D. ², Morandini E. ³, Tonon E. ¹, Drigo I. ¹, Bonci M. ¹, Agnoletti F. ¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso

²Laboratorio Tre Valli. San Michele Extra, Verona

³Agricola Tre Valli. San Martino Buon Albergo, Verona

ABSTRACT - Botulism in broiler chickens: diagnostic findings.

An outbreak of Type C botulism in 45 days old broilers was observed. Diagnosis was made on the basis of clinical findings, mouse bioassay, PCR results and *C. botulinum* type C isolation. Since 2008 an increase of type C botulism outbreaks in broiler chickens has been observed in some European countries. In Sweden the PFGE patterns obtained from *C. botulinum* type C isolated in different farms suggest that the bacteria are derived from a common source. In this Italian outbreak the source of intoxication/infection has been investigated.

Introduzione

Il botulismo è una grave patologia descritta nell'uomo e negli animali, causata dalle neurotossine prodotte da *Clostridium botulinum*, batterio Gram positivo, anaerobio obbligato, sporigeno, classificato in 7 tipi (A, B, C, D, E, F, G) in base alle caratteristiche antigeniche della tossina prodotta. Oltre a *C. botulinum* anche *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* e *Clostridium argentinense* sono in grado di produrre neurotossine antigenicamente sovrapponibili, rispettivamente, a quelle di *C. botulinum* di tipo E, F e G. La neurotossina botulinica agisce inibendo il rilascio dell'acetilcolina a livello delle terminazioni nervose, inducendo la classica sintomatologia caratterizzata da paralisi flaccida. Il botulismo aviario può essere causato da *C. botulinum* tipo A, C, D, ed E, ma il tipo C è senza dubbio prevalente mentre nei casi umani il ruolo di questo tossinotipo è assolutamente trascurabile (Kaldhusdal and Jordan, 2008). I tipi C e D sono accomunati da un mosaico di componenti uguali per le due neurotossine e dal fatto che il gene codificante la neurotossina viene veicolato da batteriofagi. Il test di riferimento per la diagnosi di botulismo è il test di tossinoneutralizzazione condotto su topino (mouse test) (Lindström e Korkeala, 2006; CDC, 1998).

La maggior parte di episodi di botulismo che si verificano nel mondo coinvolgono gli uccelli selvatici e, tra questi, soprattutto gli anatidi. Non mancano segnalazioni di malattia nel pollo e nel tacchino, anche se la specie d'allevamento più frequentemente colpita da botulismo è il fagiano, dove, in virtù dello stato semibrado in cui viene allevato, può risultare difficoltoso individuare ed allontanare le fonti d'intossicazione costituite dai cadaveri e dalle larve di mosca carnaria che su questi si sviluppano (Kurazono et al., 1974; Kaldhusdal and Jordan, 2008). Nel pollo il botulismo può insorgere in seguito all'assunzione di cibi o acqua contaminati da tossina botulinica preformata (forma tossica) oppure attraverso l'entrata in circolo di tossina prodotta nell'apparato digerente (forma tossico-infettiva) o in una ferita infetta (botulismo da ferita) (Trampel et al., 2003; Dhoms et al., 1982; Kaldhusdal and Jordan, 2008; Zhang et al., 2006). In alcuni paesi europei, negli ultimi 2 anni, si è registrato un aumento delle segnalazioni di botulismo negli allevamenti di broiler (Adjou et al., 2009; Skarin et al., 2009) e tacchini (Hafez H.

M. 2010, comunicazione personale) ma senza che venga individuata una fonte precisa d'intossicazione.

Materiali e metodi

Dati anamnestici e campionamento

A Novembre 2009, in un allevamento lombardo di 120.000 broiler di 45 giorni, è stata osservata nel 2% degli animali la comparsa di una sintomatologia riconducibile a botulismo. I soggetti colpiti presentavano ptosi palpebrale e paralisi flaccida a carico della muscolatura degli arti inferiori, delle ali e del collo (limberneck) e la mortalità ha riguardato il 100% dei soggetti sintomatici.

All'inizio della sintomatologia il gruppo è stato trattato con amoxicillina. Da 16 soggetti con evidente sintomatologia paralitica sono stati prelevati campioni di sangue per la ricerca della tossina botulinica, mentre da 5 soggetti deceduti spontaneamente, sono stati prelevati i pacchetti intestinali per la ricerca di *C. botulinum* mediante esame culturale.

Esame batteriologico

Porzioni intestinali prelevate da diversi distretti sono state introdotte in terreno d'arricchimento liquido Fortified Cooked Meat Medium (FCMM) preridotto (Iwasaki *et al.*, 1980). Le brodocolture di FCMM sono state sottoposte a shock termico (71 °C per 10 minuti) e incubate a 37 °C per 48 ore. Al termine dell'incubazione ciascuna brodocoltura è stata saggiata mediante PCR per la presenza di *C. botulinum* e i campioni positivi sono stati seminati nei seguenti terreni di coltura: Egg Yolk Agar (EYA), Blood Agar Base N°2 (Oxoid) (BAB2), Agar Sangue (AS) e FCMM. I terreni EYA e BAB2 sono stati incubati in cabina anaerobica (Bactron IV, Shellab) a 37 °C mentre le piastre di AS sono state incubate in condizioni di aerobiosi a 37 ° per verificare il grado di contaminazione da germi aerobi. Il secondo passaggio in FCMM ha subito lo stesso iter del primo. Dopo 48 ore di incubazione tutti i terreni sono stati ispezionati e le colonie sospette (lipasi e lecitinasi positive su EYA e debolmente emolitiche su BAB2) sono state risospese in terreno liquido FCMM e identificate tramite PCR per *C. botulinum*. Le brodocolture pure di *C. botulinum* sono state sottoposte alla ricerca di tossina botulinica secondo la procedura descritta di seguito.

Ricerca tossina botulinica

Le brodocolture ed i sieri per la ricerca della tossina botulinica, sono stati preventivamente sottoposti a filtrazione con filtri da 0,45 µm (Millipore) al fine di escludere contaminazioni batteriche. Ciascun siero è stato utilizzato per la ricerca della tossina mediante prova di tossinoneutralizzazione su topino (mouse test) secondo quanto descritto in letteratura (CDC, 1998). Per i tipi C e D è stato usato siero iperimmune antibotulinico fornito dal CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) mentre per i tipi A, B, E, F è stato impiegato un siero tetravalente fornito dal Centro di Riferimento Nazionale per il Botulismo (Istituto Superiore di Sanità, Roma).

Ricerca mediante PCR dei geni codificanti le neurotossine botuliniche A, B, C, D, E ed F.

Il DNA è stato estratto a partire da 175 µl di brodocoltura utilizzando l'estrattore automatico Microlab Starlet (Hamilton) ed il kit MagMax Total Nucleic Acid Isolation (Ambion). La rilevazione dei geni *BoNT/C* e *BoNT/D* è stata effettuata attraverso una duplex PCR con primers specifici per i due geni codificanti le neurotossine botuliniche

C e D e utilizzando un controllo interno di amplificazione secondo quanto descritto da Bano *et al.* (2008). Per la rilevazione dei geni *BoNT/A*, *BoNT/B*, *BoNT/E* e *BoNT/F*, codificanti rispettivamente le neurotossine A, B, E ed F, è stata utilizzata una multiplex PCR con controllo interno di amplificazione secondo quanto descritto da De Medici *et al.* (2009). I controlli positivi impiegati per la PCR vengono riportati in tabella 1.

Ceppi di referenza	Neurotossina	Geni
<i>C. botulinum</i> ATCC 19397	A	<i>BoNT/A</i>
<i>C. botulinum</i> ATCC 27765	B	<i>BoNT/B</i>
<i>C. butyricum</i> ATCC 47435	E	<i>BoNT/E</i>
<i>C. botulinum</i> NCTC 10281	F	<i>BoNT/F</i>
<i>C. botulinum</i> CCUG 7970	C	<i>BoNT/C</i>
<i>C. botulinum</i> NCTC 8265	D	<i>BoNT/D</i>

Tabella 1. Controlli positivi impiegati per la PCR.

Risultati

Dodici sieri su 16 sono risultati positivi per tossina botulinica di tipo C. Per 11 campioni la morte dei topini è avvenuta entro 24 ore dalla somministrazione mentre in 1 caso il decesso è avvenuto dopo 35 ore. Due dei 5 pacchetti intestinali conferiti sono risultati positivi alla PCR (fig. 1) per *C. botulinum* tipo C e da uno di questi il microrganismo è stato isolato al terzo passaggio su FCMM. Dopo aver verificato il mantenimento della tossicità e la purezza della coltura, le spore del ceppo isolato sono state lavate con soluzione fisiologica e stoccate a -80 °C per futuri studi epidemiologici.

I risultati di laboratorio ottenuti hanno confermato il sospetto di botulismo avanzato dal veterinario aziendale su base sintomatologica. La terapia approntata ha limitato le perdite che in altri focolai hanno raggiunto anche il 25% (Dohms *et al.*, 1982). L'indagine epidemiologica condotta in azienda non ha permesso di formulare alcuna ipotesi riguardo alla possibile fonte di contaminazione/ intossicazione.

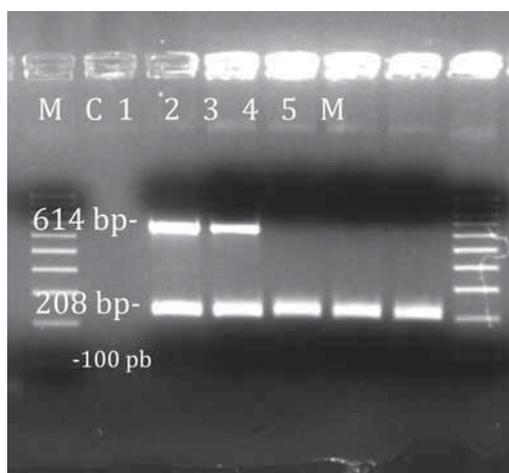


Figura 1. Immagini dei prodotti di amplificazione dopo corsa elettroforetica in gel d'agarosio. M: marker (100 bp); C: controllo negativo; 1-2: campione positivo per *C. botulinum* tipo C (614 bp) e controllo interno d'amplificazione (208 bp); 3-4-5: campioni negativi e controlli interni d'amplificazione.

Discussione e conclusioni

Il botulismo aviario è una malattia nota da tempo e per molti anni la sua diagnosi è stata affidata esclusivamente al test di tossinoneutralizzazione su topino che ancora oggi rimane il gold test per questa malattia, sebbene stiano sempre più diffondendosi test ELISA per la ricerca della tossina (Lindström and Korkeala, 2006). Nel presente focolaio non tutti i sieri dei soggetti sintomatici sono risultati positivi per neurotossina botulinica. Questo risultato potrebbe essere legato da un lato ai limiti di sensibilità del metodo e dall'altro a una mancanza di neurotossina circolante poiché già legata ai terminali colinergici. In questi casi il sostegno della biologia molecolare potrebbe rivelarsi utile soprattutto per determinare in tempi rapidi il tipo di *C. botulinum* implicato nel focolaio, informazione indispensabile nei casi di botulismo umano e dei grossi animali qualora si rendesse necessario intervenire rispettivamente con sieroterapia o con vaccinazione d'urgenza. Inoltre, come dimostrato nel presente episodio, la PCR è risultata molto utile per l'isolamento del ceppo di *C. botulinum* che potrà essere utilizzato per futuri studi epidemiologici su base genetica.

Per molti anni l'enterite necrotica da *C. perfringens* è stata considerata la malattia ad eziologia clostridica più diffusa nell'allevamento del pollo da carne. Ultimamente è stato registrato un aumento in Europa di altre 2 importanti patologie che in passato comparivano solo sporadicamente: la dermatite gangrenosa e il botulismo (Adjou *et al.*, 2009; Skarin *et al.*, 2009). Nel caso del botulismo questo incremento non riguarda solo il comparto avicolo ma anche gli allevamenti di vacche da latte e bovini da carne dove, in pochi mesi, tra il 2008 e il 2009, in Veneto, Trentino e Lombardia sono stati registrati 6 importanti focolai (Bano *et al.*, 2009). Le cause di questo incremento non sono note ma dovrebbero essere indagati eventuali fattori predisponenti comuni. E' auspicabile che questi vengano sempre diagnosticati con certezza e segnalati per consentire di ricostruire il quadro epidemiologico della malattia e permettere di indagarne le cause.

Bibliografia

1. Adjou K. T., Maedes S., Danguy R., Brugere- Picoux J. 2009. Laboratory investigation of avian botulism in France. Atti del XVI World Veterinary Poultry Association Congress, 8-12 Novembre, Marrakesh, Marocco. Pag. 150.
2. Bano L., Anniballi F., Delibato E., De Medici D., Agnoletti F., Cocchi M., Drigo I., Magistrali C., Fontana M. C., Merialdi G., Arossa C., Fencia L. 2008. Avian botulism in Italy: application of a duplex PCR assay as a useful tool for the isolation of neurotoxicogenic strains. Atti del convegno: *Clostridium botulinum*-epidemiology, diagnosis, genetics, control and prevention, 16-19 June, Helsinki, Finland.
3. Bano L, Schiavon E., Drigo I., Gaspari L., Zanette G., Brino A., Fencia L., Anniballi F., Agnoletti F., Rampin F., Alberton A., Bonfanti L., Barberio A., Ferrarese A. 2009. Episodi di botulismo bovino nella regione Veneto: aspetti clinici e diagnostici. Rivista di Buiatria. 2:3-10.
4. CDC, 1998. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA (<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/botulism.pdf>).

5. De Medici D., Anniballi F., Wyatt G.M, Lindstro M., Messelha"u"ber U., Aldus C.F., Delibato E., Korkeala H, Peck W, Fenicia L. 2009. Multiplex PCR for Detection of Botulinum Neurotoxin-producing Clostridia in clinical, food, and environmental samples. *Appl. Env. Microbiol.* 75(20): 6457-6461.
6. Dohms J. E., Allen P. H., Rosemberg J. K. 1982. Cases of type C botulism in broilers chickens. *Avian Diseses*, 26:204-210.
7. Galey F. D., Terra R., Walker R., Adaska J., Etchebarne M. A., Puschner B., Fisher E., Whitlock R. H., Rocke T., Willoughby D., Tor E. 2000. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12:204-209.
8. Iwasaki M., Ohishi I, Sakaguchi G. 1980. Evidence that botulinum C2 toxin has two dissimilar components. *Infect. Immun.*, 29:390-394.
9. Kaldhusdal M., Jordan F. T. W. *Clostridium botulinum* (botulism, limberneck). 2008. In: *Poultry Diseses*, 6th Edition. Pattison M., McMullin P. F., Bradbury J. M., Alexander D. J. Ed. Saunders, Elsevier. Pp.208-211.
10. Kurazono H., Shimozawa K., Sakaguchi G. Takahashi M., Shimizu T., Kondo H. 1974. Botulism among penned pheasants and protection by vaccination with C1 toxoid. *Res. Vet. Sci.*, 38:104-108.
11. Lindstr"om M., Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. 2006. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2):298–314.
12. Lindstr"om M., Keto R., Markkula A., Nevas M., Hielm S., Korkeala H. 2007. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl. Env. Microbiol.*, 67: 5694-5699.
13. Skarin H., Blomqvist G., Aspan A., Lindberg A., Baverud V. 2009. Comparative analysis of *Clostridium botulinum* type C isolates from botulism outbreaks in swedish broiler farms. *Atti del 6th ClostPath International Conference – Clostridia: the impact of genomics on disease control.* Roma, 19-23 Ottobre.
14. Zhang G., Mathis G. F., Darius S., Smith S. R., Ritchie S. J. 2006. A case of botulism in commercial broilers. *Proceeding of the 55th WPDC*, 5-8 marzo, Sacramento, CA, Usa.

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.

FARMACOSENSIBILITÀ DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* NETB POSITIVI E NETB NEGATIVI ISOLATI DA POLLO E DIFFUSIONE DI ALCUNI GENI DI RESISTENZA

Bano L., Bacchin C., Marcon B., Drigo I., Bonci M., Agnoletti F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso

ABSTRACT - Antimicrobial susceptibility and distribution of *tet* and *erm* resistance genes among *netB* positive and *netB* negative *Clostridium perfringens* isolates of chicken origin.

The minimal inhibitory concentration (MIC) of six antimicrobial agents was determined for 30 *netB* positive and 30 *netB* negative *C. perfringens* field strains of chicken origin, isolated from 2005 to 2009 in Italy. 53 strains were isolated from broilers and 7 from layer hens affected by enteric disorders, in 60 different farms. The occurrence of the tetracycline resistance genes *tetK*, *tetL*, *tetM* and macrolide resistance genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, was determined for all isolates by PCR. All strains tested susceptible to amoxicillin and tiamulin with MICs ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Susceptibility to tetracycline was found in only 16.6% of tested strains and *tetM* gene was detected in two resistant strains. 81.7% of strains showed MICs values in the range of susceptibility for tylosin (0.125-0.25 $\mu\text{g/ml}$) but slightly-resistant (2-16 $\mu\text{g/ml}$) and high-resistant (≥ 512 $\mu\text{g/ml}$) sub-populations were observed. *ErmB* gene was detected in 2 strains positive also for *tetM* gene, irrespective of tylosin susceptibility. A bimodal distribution of MICs was seen with zinc-bacitracin: 80% of strains resulted susceptible and 20% resistant. Resistance to lincomycin was found in the 71.6% of tested strains. No significant differences in MICs values were observed with respect to broiler or layer hens origin and *netB* gene presence.

Introduzione

Il bando dell'utilizzo dei promotori di crescita nei mangimi degli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo, in vigore in Europa già dal 2006, ha determinato nel pollo da carne un aumento dell'incidenza delle patologie sostenute da clostridi e, in particolare, di quelle enteriche che vedono implicato *Clostridium perfringens* (enterite necrotica e disbatteriosi) (Van Immerseel *et al.*, 2009). Il controllo di queste infezioni è affidato ad antibiotici attivi nei confronti di microrganismi Gram-positivi, fra i quali i beta-lattamici, i macrolidi, le tetracicline, le pleuromutiline, i lincosamidi e, fuori Europa, la zinco-bacitracina.

L'impiego di tali farmaci dovrebbe essere mirato nei confronti del ceppo di *C. perfringens* isolato in corso di malattia e caratterizzato per quanto riguarda la presenza di alcuni markers genetici di patogenicità, quali il gene che codifica la tossina NetB, ritenuta uno dei fattori di virulenza fondamentali nella comparsa dell'enterite necrotica del pollo (Keyburn *et al.*, 2008).

Secondo il Clinical Laboratory Standard Institute per valutare la farmacosenibilità dei clostridi è necessario fare ricorso alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) mediante diluizione in agar; questo

metodo, tuttavia, richiede tempi lunghi, spesso non compatibili con le esigenze del veterinario di campo. Per questo motivo si rende necessario il monitoraggio periodico della sensibilità dei ceppi di *C. perfringens* isolati in corso di malattia (Johansson *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2009; Watkins *et al.* 1997). Oggi, inoltre, è possibile studiare la farmacosenibilità batterica mediante tecniche di biologia molecolare che consentono di evidenziare la presenza di alcuni geni di resistenza. I geni di resistenza più frequentemente diffusi nel genere *Clostridium* sono *tetK*, *tetL*, *tetM* per le tetracicline ed il gene *ermC* per i macrolidi (Roberts, 2003). Con il presente studio si è voluta indagare la farmacosenibilità di ceppi di *C. perfringens* *netB* positivi e *netB* negativi isolati da pollo, attraverso la determinazione della MIC e la ricerca di alcuni geni di resistenza alle tetracicline ed ai macrolidi.

Materiali e metodi

Ceppi batterici

Sono stati selezionati 60 ceppi di *C. perfringens* (30 *netB* positivi e 30 *netB* negativi) provenienti da 60 aziende diverse, isolati tra il 2005-2009, ed ottenuti da ovaiole (7 ceppi) e polli da carne (53 ceppi) con lesioni a carico dell'apparato gastroenterico. Gli isolamenti sono stati ottenuti in terreno Perfringens Agar Base (Oxoid) addizionato con il selettivo SFP (Shahidi-Ferguson-Perfringens Selective Supplement, Oxoid) e globuli rossi di montone (5%, v/v), mentre per la determinazione del gene *netB* è stata impiegata la PCR secondo il protocollo proposto da Keyburn (2008). I ceppi batterici erano stati conservati -80 °C in cryo-banks (Nalgene) fino al momento delle analisi.

Determinazione della minima concentrazione inibente

Per la determinazione della MIC è stato utilizzato il metodo della diluizione in agar secondo il protocollo riportato nel manuale CLSI M11-A7 (2007). I principi attivi esaminati sono stati: amoxicillina (amoxicilin powder, A8523, Sigma), tilosina (tylosin tatrtrate powder, T6134, Sigma), tiamulina (tiamulin fumarate powder, 46959, Sigma), tetraciclina (tetracycline hydrochloride powder, T4062, Sigma), lincomicina (lincomycin hydrochloride powder, 62143, Sigma), zinco-bacitracina (bacitracin zinc salt from *Bacillus licheniformis*, B5150, Sigma); gli standard analitici sono stati solubilizzati secondo le istruzioni del produttore. Come terreno base è stato impiegato il Brucella Agar (Oxoid) supplementato con emina (5 µg/ml), vitamina K (1 µg/ml) e sangue di montone laccato (5% v/v). Ciascun farmaco è stato incluso nel terreno a concentrazioni comprese tra 0,06 e 512 µg/ml e gli inoculi sono stati allestiti da sospensioni batteriche con torbidità pari a 0,5 McFarland. Le piastre inoculate sono state incubate a 35-37 °C per 48h in condizioni di anaerobiosi.

I risultati sono stati espressi in µg/ml e, per ciascun farmaco, è stata calcolata la MIC in grado di inibire la crescita del 50% e del 90% dei ceppi testati (MIC₅₀ e MIC₉₀ rispettivamente) nonché la media geometrica delle MIC.

I ceppi di riferimento *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* ATCC 700057, *B. fragilis* ATCC 25285 sono stati inseriti in ogni piastra come controllo.

Ricerca dei geni di resistenza tet e erm

Cinque colonie di ciascun ceppo di *C. perfringens* sono state risospese in PBS. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit Magmax Total Nucleic Acid Isolation (Ambion) e l'estrattore automatico Microlab Starlet (Hamilton). Sono stati ricercati i geni di resistenza alle tetracicline denominati *tetK*, *tetL*, *tetM*, e i geni di resistenza ai macrolidi *ermA*, *ermB*, *ermC* applicando i protocolli riportati in letteratura (Ng *et al.*, 2001; Jae-Hyuk *et al.*, 2009). I controlli positivi per i geni *tet* e *erm* sono stati gentilmente forniti rispettivamente dal Dr. Schwaiger della facoltà di microbiologia dell'università di Monaco (Germania) e dal Dr. Morelli della facoltà di Agraria di Piacenza.

Risultati

Minima concentrazione inibente

La distribuzione delle MIC, le MIC₅₀ e le MIC₉₀ delle molecole testate sono riportate in tabella 1.

Le MIC di tiamulina, amoxicillina, tilosina e zinco-bacitracina nei confronti dei ceppi di campo di *C. perfringens*, sono risultate molto simili alle minime concentrazioni degli stessi principi attivi che hanno inibito il ceppo di riferimento ATCC 13124. Al contrario le MIC di lincomicina e tetraciclina nei confronti dei ceppi di campo sono risultate superiori a quelle ottenute verso il ceppo di riferimento, rispettivamente di due e otto diluizioni (tabella 2).

Non sono state osservate differenze significative di farmacosenibilità né tra i ceppi *netB* positivi e *netB* negativi, né tra ceppi isolati da polli da carne o ovaiole.

Geni di resistenza tet e erm

In due ceppi è stata evidenziata la simultanea presenza del gene di resistenza alle tetracicline *tetM* e del gene di resistenza ai macrolidi *ermB*. Uno di questi ceppi è inoltre risultato positivo al gene di resistenza alle tetracicline *tetL*.

Discussione e Conclusioni

Rispetto a studi simili condotti in altri paesi, le differenze maggiori hanno riguardato i valori di MIC della tetraciclina che in questo lavoro sono risultate tendenzialmente superiori rispetto a quelli registrati in Danimarca, Norvegia e Svezia, ma in linea rispetto a quelli ottenuti in Belgio e Brasile (Johansson *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2009). Infatti, secondo i criteri interpretativi riportati nel manuale del CLSI (2007), solo il 16% dei ceppi testati si è dimostrato sensibile alla tetraciclina, considerata molecola marker per la valutazione della farmacosenibilità della famiglia delle tetracicline, mentre il 35% è risultato intermedio e il 48,4% resistente. Tra i ceppi resistenti alla tetraciclina, solo 2 possedevano il gene di resistenza *tetM*, che codifica l'omonima proteina responsabile della protezione del ribosoma dall'azione delle tetracicline (Chopra and Roberts, 2001). Questa discrepanza tra risultati fenotipici e genotipici non sorprende ed è legata alla complessità dei fattori, non solo genetici, che regolano le resistenze di un microrganismo ad un antimicrobico.

L'amoxicillina è la molecola che ha dimostrato la più elevata attività *in vitro* con MIC₅₀ ≤ 0,125 µg/ml e MIC₉₀ = 0,032 µg/ml. Questi valori cadono al disotto del break

point di sensibilità fissato per l'ampicillina in 0,5 µg/ml (CLSI, 2007). Questo risultato, evidenziato anche in altri studi condotti su ceppi di pollo, differisce da quanto osservato nel bovino, ove sono stati osservati valori di MIC₉₀ più elevati nei confronti delle penicilline (Sasaki *et al.*, 2001).

La tiamulina è una molecola scarsamente utilizzata nell'allevamento del pollo da carne in virtù della sua incompatibilità dose-dipendente con alcuni ionofori impiegati comunemente per il contenimento della coccidiosi, ma potrebbe trovare spazio in quegli allevamenti di broiler dove è stato intrapreso un approccio vaccinale nei confronti della coccidiosi, o nella terapia dell'enterite necrotica sporadicamente osservata negli allevamenti di ovaiole (Dhillon *et al.*, 2004). Per tale principio attivo non esistono dei break points ufficiali (CLSI) e, adottando quelli proposti da Giguère (2006) che classifica come sensibili i ceppi batterici con MIC ≤ 4 µg/ml, tutti i ceppi da noi esaminati risultano sensibili. Per la famiglia dei macrolidi è stata saggiata la tilosina che trova largo impiego negli allevamenti del pollo, e specialmente in quelli di ovaiole, grazie alla sua efficacia nei confronti di micoplasmi e di batteri Gram-positivi. Per ovviare alla mancanza di break points ufficiali (CLSI) per la tilosina, è possibile adottare i criteri proposti da Johanson *et al.* (2004), che suggerisce di basarsi sulla distribuzione bimodale delle MIC. Per questa molecola sono state osservate tre subpopolazioni (grafico 1) con MIC nettamente separate da almeno 2 diluizioni.

La prima popolazione, che può essere definita “sensibile”, raggruppa l'81,7% dei ceppi con valori di MIC ≤ 0,25 µg/ml; la seconda popolazione è costituita dal 15% dei ceppi con valori di MIC compresi tra 2 e 16 µg/ml e può essere definita “intermedia” o “moderatamente resistente” mentre il 3,3% dei ceppi presenta valori di MIC ≥ 512 µg/ml e può indubbiamente essere considerata “resistente”. A quest'ultima popolazione appartiene anche uno dei due ceppi risultati positivi in PCR al gene *ermB*, mentre l'altro ceppo positivo ricade nel range di sensibilità. In base a questo risultato, i geni di resistenza ai macrolidi *ermA*, *ermB*, *ermC* sembrerebbero insufficienti per lo studio della farmacoresistenza alla tilosina dei ceppi di *C. perfringens*.

I ceppi di *C. perfringens* vengono considerati sensibili alla lincomicina per valori di MIC ≤ 1 µg/ml (Martel *et al.*, 2004) e, in base a questo valore, il 71,6% dei ceppi testati si è dimostrato resistente. Questo dato coincide con i risultati ottenuti in Brasile (Silva *et al.*, 2009) ma è sensibilmente superiore rispetto a quelli del Belgio, dove le resistenze hanno riguardato il 43% dei ceppi esaminati (Martel *et al.*, 2004). In uno studio analogo condotto negli USA la resistenza ha caratterizzato il 100% dei ceppi testati con valori di MIC ≥ 8 µg/ml (Watkins *et al.*, 1997).

La bacitracina è una molecola registrata in Italia solo per gli allevamenti cunicoli, ma viene ampiamente utilizzata negli allevamenti avicoli in molti paesi extraeuropei per il trattamento dell'enterite necrotica. Nel presente studio è stata osservata una distribuzione bimodale delle MIC con l'80% dei ceppi che si attesta su valori di MIC inferiori al break point di sensibilità, stabilito secondo Chalmers *et al.* (2008) in 16 µg/ml.

Il presente studio rappresenta il primo report eseguito in Italia sulla farmacosenibilità di *C. perfringens* isolati dal pollo in corso di malattia. La

valutazione periodica della sensibilità di *C. perfringens* potrebbe rappresentare uno strumento per ottimizzare l'efficacia delle terapie dell'enterite necrotica, nell'ottica di un uso prudente e responsabile del farmaco veterinario.

Bibliografia

1. Chalmers G., Martin S.W., Hunter D.B., Prescott J.F., Weber L.J., Boerlin P. 2008. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Veterinary Microbiology*, 127, 116-127.
2. Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistences. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65, 232-260.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, seventh ed. CLSI document M11-A7, vol. 27, No. 2. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
4. Dhillon A. S., Roy P., Lauerman L., Schaberg D., Weber S., Bandli D., Wier F. 2004. High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. *Avian Diseases*, 48:675-680.
5. Giguère S. 2006. Macrolides, azalides and ketolides. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. and Dowling P.M. Eds. Fourth ed. Blackwell Publishing, Ames. Iowa, 191-205.
6. Giguère S. 2006. Lincosamides, pleuromutilins, and streptogramins. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. and Dowling P.M. Eds. Fourth ed. Blackwell Publishing, Ames. Iowa, 2006, 179-190.
7. Jae-Hyuk J., Yoon Eun-Jeong, Choi Eung-Chil, Choi Sung-Sook. 2009. Development of taqMan probe-based real-time PCR method for *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, rapid detection of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance genes, from clinical isolates. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*., 19(11):1464-9.
8. Johansson A., Greko C., Engström B. E., Karlsson M. 2004. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*, 99:251–257.
9. 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.
10. Martel A., Devrise L. A., Cauwerts K., De Gussem K., Decostere A., Haesebrouck F. 2004. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathology*, 33(1):3-7.
11. Ng L. K., Martin I., Alfa M., Mulvey M. 2001. Multiplex PCR for detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15:209-215.

12. Roberts M. C. 2003. Acquired tetracycline and/or macrolide–lincosamides–streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe*, 9:63-69.
13. Sasaki Y., Yamamoto K., Tamura Y., Takahashi T. 2001. Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary Microbiology*, 83:61-69.
14. Silva R. O. S., Salvarani F. M., Assis R.A., Martins N. R. S., Pires P. S., Lobato, F. C. F. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:262-264.
15. Van Immerseel F., Rood J. I., Moore R. J., Titbal R. W. 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends in Microbiology* 17(1):32-36.
16. Watkins K. L., Shryock T. R., Dearth R. N., Saif Y. M. 1997. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Veterinary Microbiology*, 54:195-200.

Grafico 1. Distribuzione delle MIC della tilosina.

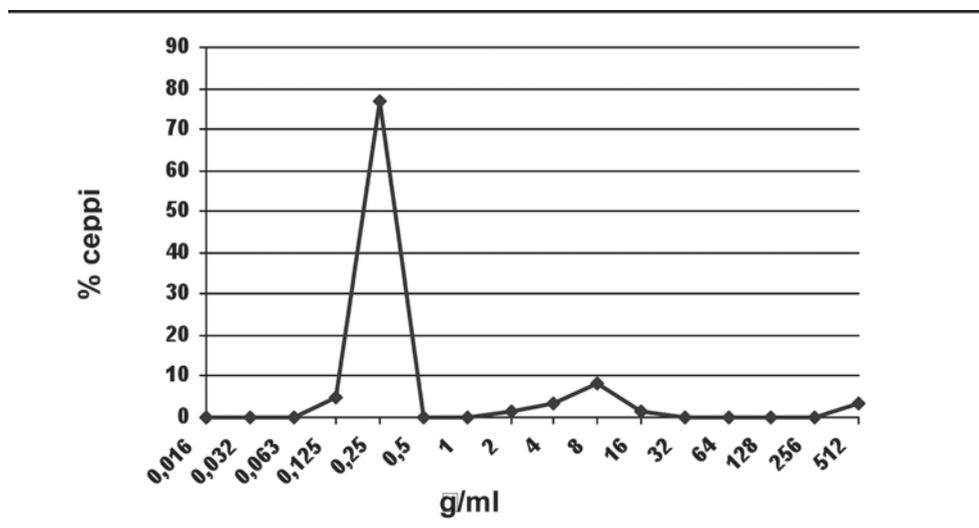


Tabella 1. Distribuzione delle minime concentrazioni inibenti, MIC₃₀ e MIC₉₀ dei sei principi attivi testati nei confronti di 60 ceppi di *C. perfringens* isolati da pollo.

	MIC	(µg/ml)	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	MIC50	MIC90
Tiamulina					16	7	10	21	6									1	2
Amoxicillina	41	17	1															0,016	0,032
Tilosina			3		46			1	2	5	1						2	0,25	8
Bacitracina						2	13	31	2				5	7				2	128
Lincomicina			14		2		1	9	13	6	7			4	4			4	128
Tetraciclina			2		2				6	21	21	8						8	32

Tabella 2. Confronto tra le medie geometriche delle MIC ottenute dai ceppi testati e le MIC dei ceppi di riferimento testati.

	Tiamulina	Amoxicillina	Tilosina	Zinco-bacitracina	Lincomicina	Tetraciclina
<i>C. difficile</i> ATCC 700057	4-8	1	0,125-0,25	128-256	8	64
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	1	16	0,25-0,5	512	4	0,5
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	0,5	0,016	0,25	2	0,25	0,125-0,5
media geometrica delle MIC dei ceppi testati	0,93	0,021	0,45	3,65	3,00	8,88



Non contiamo sulla fortuna.



Alla IZO contano soltanto le certezze. Per questo da oltre trent'anni IZO produce farmaci e vaccini ad uso veterinario altamente affidabili. Qualità totale e innovazione tecnico-scientifica per IZO sono dei capisaldi per raggiungere un duplice obiettivo: la protezione e il benessere degli animali da reddito.
Per scongiurare ogni rischio crediamo solo nella scienza.

IZO S.p.A.

Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia • Tel. 030 24 20 583 • Fax 030 24 20 550 • www.izo.it



SPONDILITE DA *ENTEROCOCCUS CECORUM* NEL POLLO DA CARNE

Bano L.¹, Bonci M.¹, Drigo I.¹, Ferro T.¹, Vascellari M.², Cesca A.³, Agnoletti F.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di istopatologia

³Medico veterinario libero professionista

ABSTRACT - *Enterococcus cecorum* spondylitis in broiler chickens.

The present paper reports an outbreak of spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in a flock of 120,000 broiler chickens located in Veneto region. The birds submitted to our laboratory were six weeks old and showed a “kinky-back”-like syndrome, characterized by lameness and paresis, which affected 10% of the birds of the flock since about the age of 30 days. Three of the examined chickens showed chronic inflammatory lesions on the ventral side of the spine at T4-T5 level. The bacteriological examination of the vertebral lesions yielded a pure culture of catalase negative, Gram positive cocci identified as *Enterococcus cecorum*. *In vitro* antimicrobial susceptibility of the isolated strains was tested and resistance to tetracycline was detected. Possible hypothesis on the pathogenesis of the described infection are also suggested.

Key words: broiler, spondylitis, *Enterococcus cecorum*.

Introduzione

I batteri appartenenti al genere *Enterococcus*, in passato raggruppati nel sierogruppo di Lancefield “D” del genere *Streptococcus*, sono dei cocchi Gram-positivi disposti singolarmente o a coppie, catalasi negativi, caratterizzati dalla comune capacità d'idrolizzare l'esculina. Sono ampiamente distribuiti in natura e possono essere rinvenuti nel suolo, nell'acqua, nei vegetali, e nel tubo gastroenterico di uomo e animali, inclusi uccelli ed insetti (Teixeira and Facklam, 2003).

In patologia aviaria le malattie attribuite ad enterococchi sono infrequenti e solitamente riguardano infezioni embrionali con mortalità in uovo o infezioni del residuo del sacco vitellino che avvengono nel primo giorno di vita e che hanno alla base una cattiva gestione di queste importanti fasi della vita del pulcino (cosiddetta “poor chick quality”). Sporadicamente sono state segnalate blefaro-congiuntiviti, celluliti, endocarditi, artriti ed encefalomalacia associate a varie specie di enterococchi. Nel pollo le specie più frequentemente isolate in corso di malattia sono *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans* ed *Enterococcus faecalis* (Smyth and McNamee, 2008). Negli ultimi anni sono aumentate in modo preoccupante nel pollo da carne, le segnalazioni di osteomieliti a carico di ossa lunghe e corpi vertebrali, associate alla presenza di *Enterococcus cecorum*: uno dei microrganismi numericamente più rappresentati nel tubo gastroenterico del pollo (Charlton *et al.*, 2009; De Herdt *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2002). Sino al 2008 esisteva un'unica segnalazione di tale patologia, osservata in Gran Bretagna in gruppi di polli da carne di 4-5 settimane, in cui *E. cecorum* era stato isolato sia da osteomieliti delle vertebre toraciche che da lesioni di osteonecrosi a carico dell'epifisi femorale prossimale, definite comunemente “necrosi della testa del femore” (Wood *et al.*, 2002). Ma studi retrospettivi condotti da Charlton (2009) e De Herdt (2009) hanno dimostrato che la sintomatologia cosiddetta “kinky-back” (McMullin P., 2004) associata a spondilite da *E. cecorum*, era in costante aumento già a partire dal 2006.

Di seguito vengono riportati i rilievi clinici, anatomopatologici, istologici e batteriologici raccolti durante un focolaio di spondilite da *E. cecorum* del broiler osservato in Italia.

Materiali e metodi

Dati anamnestici

A fine gennaio 2010, in 6 capannoni di un allevamento di 120.000 broiler Ross 708 di 25 giorni, è stata osservata una sintomatologia caratterizzata da difficoltà di deambulazione, decubito prolungato sui tarsi e sul coccige e difformità d'accrescimento del gruppo. I soggetti colpiti erano circa il 10% dell'effettivo e alcuni di questi presentavano tumefazioni a carico delle articolazioni tibiotarsiche e utilizzavano le ali per aiutarsi nella deambulazione. Tutti gli animali allevati nei 6 capannoni dove si era manifestato il problema, facevano parte di un'unica partita di pulcini mentre negli altri 6 capannoni erano ospitati soggetti della stessa età provenienti da una differente schiusa e non veniva riferita alcuna problematica sanitaria. All'arrivo i pulcini erano stati trattati con enrofloxacin per problemi di onfaliti settiche e, al momento della comparsa della sintomatologia motoria, avevano subito un primo trattamento con amoxicillina, seguito da un trattamento con doxiciclina, senza osservare alcun miglioramento.

Esame anatomopatologico

L'esame anatomopatologico è stato eseguito su 5 soggetti di 44 giorni con la sintomatologia sopradescritta e su un soggetto che manifestava evidente ritardo nell'accrescimento. Prima di essere sacrificati da ciascun animale è stato eseguito un prelievo di sangue per indagini sierologiche.

Accertamenti batteriologici

Dalle lesioni a carico della colonna vertebrale, delle articolazioni tibiotarsiche e dalla milza è stato eseguito l'esame batteriologico utilizzando come terreni di coltura agar sangue, addizionato con esculina, ed EMB (Eosin Methylene Blue). I terreni sono stati incubati a 37 °C in aerobiosi ed ispezionati a 24, 48 e 72 ore.

Inizialmente gli isolati batterici sono stati sottoposti a colorazione di Gram, al test della catalasi ed è stata verificata l'idrolisi dell'esculina. Tutte le colture batteriche riconducibili ad *Enterococcus* spp., sono state sottoposte ad identificazione mediante galleria API rapid ID 32 STREP V3.0 (Bio Merieux). La farmacosenibilità dei ceppi batterici identificati è stata saggiata secondo il metodo della diffusione in agar nei confronti di penicillina, ampicillina, oxacillina, amoxicillina più ac. clavulanico, cefalotina, cefquinome, eritromicina, tilosina, spiramicina, clindamicina, tetraciclina, enrofloxacin, sulfamethoxazolo più trimethoprim, tiamulina (NCCLS, 2002). Il materiale patologico prelevato da lesioni ossee ed articolari è stato anche esaminato mediante PCR specifica per *Mycoplasma synoviae* (Marois *et al.*, 2000).

Accertamenti istopatologici

Nel corso dell'esame anatomopatologico, sono stati prelevati campioni di tessuto osseo vertebrale e splenico, fissati in formalina tamponata al 10% e routinariamente processati per l'allestimento del preparato istologico. Dopo inclusione in paraffina, sono state allestite sezioni di 4 µm, colorate con ematossilina ed eosina e osservate al microscopio ottico. Su ulteriori sezioni è stata inoltre eseguita la colorazione istochimica di Gram.

Ulteriori accertamenti collaterali

Dal siero sono stati ricercati anticorpi verso *Mycoplasma synoviae*, il virus dell'anemia infettiva del pollo e del sierotipo M41 del virus della bronchite infettiva mediante siero agglutinazione rapida, ELISA e inibizione dell'emoagglutinazione, rispettivamente. Inoltre è stato eseguito l'esame parassitologico tramite osservazione microscopica diretta di raschiati della mucosa intestinale eseguiti in vari distretti.

Risultati

Due dei 5 soggetti con difficoltà di deambulazione presentavano artrite fibrinosa a livello di articolazione tibiotarsica mentre negli altri 3 si evidenziavano delle protuberanze fibro-cartilaginee con centro necrotico a carico della porzione ventrale del rachide, tra T4 e T5 (figura 1). Le lesioni erano meglio ispezionabili dopo asportazione di reni e polmoni. Istologicamente si apprezzava un processo purulento-necrotico a carico del tessuto osseo associato alla presenza di aggregati batterici e una iperplasia splenica. All'esame batteriologico condotto sul materiale patologico prelevato dalle lesioni vertebrali si apprezzava la crescita di colonie tonde con margini regolari grigiastre, esculina positive e catalasi negative, maggiormente evidenti dopo 48 ore d'incubazione su agar sangue mentre su terreno EMB le colonie erano scarsamente visibili anche dopo 72 ore. Microscopicamente le colture batteriche apparivano costituite da cocci Gram-positivi leggermente allungati disposti singolarmente o a coppie identificati biochimicamente come *Enterococcus cecorum*. A livello articolare è stato isolato uno streptococco esculina negativo, non identificabile mediante i kit biochimici utilizzati. I ceppi di *E. cecorum* isolati sono risultati sensibili a penicillina, ampicillina, amoxicillina più ac. clavulanico, cefalotina, cefquinome, enrofloxacin, sulfamethoxazolo più trimethoprim e tiamulina. L'esame batteriologico della milza ha dato esito negativo. Il soggetto di scarto presentava aerosacculite e pericardite fibrinosa associate alla presenza di *E. coli*. La PCR per *M. synoviae* è risultata negativa sia per le lesioni vertebrali che per quelle tibiotarsiche mentre la sierologia per *M. synoviae* ha dato esito positivo in 2 soggetti, di cui uno con artrite e l'altro con spondilite. Sierologicamente gli animali esaminati sono risultati negativi per anemia e positivi, con titoli vaccinali, alla bronchite infettiva. Tre soggetti con lievi lesioni emorragiche puntiformi sulla mucosa duodenale, sono risultati positivi per coccidi in carica medio-bassa.

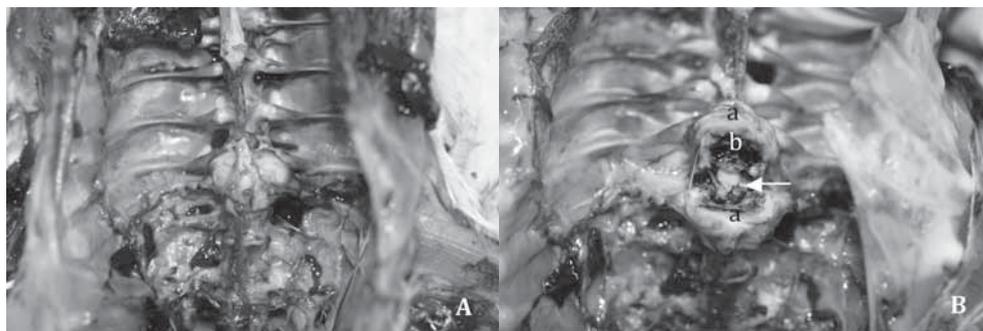


Figura 1. A: protuberanza fibro-cartilaginea tra T4 e T5. B: sezione della lesione vertebrale in cui sono distinguibili la capsula fibro-cartilaginea (a), il materiale osteo-necrotico al centro della lesione (b) e il midollo spinale (freccia).

Discussione e conclusioni

Nell'allevamento del pollo da carne le lesioni a carico dell'apparato muscolo-scheletrico sono economicamente penalizzanti in quanto si ripercuotono sulle performance zootecniche finali. Nell'ultimo anno si è assistito in USA e Belgio ad un aumento delle segnalazioni di problemi di deambulazione legati a osteomieliti vertebrali dalle quali è stato isolato ripetutamente *E. cecorum* (Charlton *et al.*, 2009; De Herdt *et al.*, 2009). Il confronto tra l'episodio descritto negli USA da Charlton (2009) verificatosi in estate e il presente caso clinico, osservato in inverno, porta ad escludere un'influenza della stagionalità sulla comparsa della spondilite da *E. cecorum*. In entrambi i casi è stata osservata una comune origine della partita nella quale si è manifestato il problema, e questo fa ritenere che possa esservi una predisposizione genetica alla malattia o, in alternativa, che alla base vi sia una cattiva gestione della fase d'incubazione e schiusa del gruppo colpito (poor chick quality). Nonostante restino ancora da chiarire molti aspetti legati alla patogenesi, sostanzialmente possono essere formulate tre ipotesi per tentare di spiegare la localizzazione vertebrale di *E. cecorum*. La prima è che tale enterococco abbia colonizzato il rachide a partire da infezioni del sacco vitellino avvenute durante la vita embrionale o nel periodo di schiusa. Tale infezione vertebrale avrebbe concorso all'indebolimento delle strutture ossee, rendendole inadatte a sostenere il peso delle masse muscolari sviluppatesi successivamente e portando alla sintomatologia clinica. A sostegno di tale ipotesi vi sarebbero sia il carattere di cronicità delle lesioni vertebrali testimoniato dalla proliferazione di tessuto fibro-cartilagineo che la comune origine della partita. La seconda ipotesi è che il microrganismo possa penetrare per via ascendente da lesioni podali. Questo spiegherebbe perché alcuni autori hanno isolato il microrganismo da artriti a carico delle articolazioni tibiotarsiche o a livello di testa del femore (Wood *et al.*, 2002; Charlton *et al.*, 2009; De Herdt *et al.*, 2009), ma non chiarirebbe il perché della sua localizzazione in alcuni distretti della colonna vertebrale. La terza ipotesi è che *E. cecorum* entri nel torrente circolatorio a partire dal tubo gastroenterico e che si localizzi a livello vertebrale in seguito ad una più intensa vascolarizzazione di un distretto che, a causa di una sollecitazione meccanica (es. kinky-back), è già interessato da fenomeni infiammatori per i quali si sospetta una predisposizione genetica (McMullin, 2004). Tale ipotesi spiegherebbe la localizzazione delle lesioni in corrispondenza di articolazioni intervertebrali che consentono movimenti di flessione del rachide pollo (come tra T4 e T5) e non a livello di altri corpi vertebrali tra loro sinostosiati. In questo distretto *E. cecorum* causerebbe la lisi del tessuto osseo: capacità riconosciuta agli enterococchi anche in medicina umana (Tarr *et al.*, 2004).

L'inefficacia dei trattamenti potrebbe essere dovuta da un lato alla resistenza di *E. cecorum* alla tetraciclina (verificata *in vitro*) e dall'altro alla particolare localizzazione del microrganismo, difficilmente raggiungibile dal farmaco, soprattutto se somministrato per via orale. In medicina umana le osteomieliti settiche vengono infatti trattate con beta-lattamici somministrati per via endovenosa in infusione continua per tempi prolungati (Tarr *et al.*, 2004), pratica improponibile nell'allevamento avicolo.

Bibliografia

1. Charlton B. R., Cooper G. L., Stoute S., Bickford A. A., Senties-Cue C. 2009. *G. Enterococcus cecorum* osteomyelitis. Atti LVIII Western poultry Disease Conference, 23-25 Marzo, Sacramento, California. Pp. 98-99.
2. De Herdt P., Defoort P., Van Steelant J., Swam H., Tanghe L., Van Goethem S., Vanrobaeys M. 2009. *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. Atti del XVI World Veterinary Poultry Association Congress, 8-12 Novembre, Marrakesh, Marocco. Pag. 173.
3. Gong J., Forster R. J., Yu H., Chambers J. R., Wheatcroft R., Sabour P. M., Chen S. 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. FEMS Microbiology Ecology 41:171-179.
4. Marois C., Oufour-Gesbert F., Kempf I. 2000. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology, 73:311-318.
5. McMullin P. 2004. Spondylolisthesis, kinky-back. In: a pocket guide to poultry health and disease. McMullin.. Ed. 5M Enterprises. Pp. 193-194.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard, 2nd edition. NCCLS document, M31-A2. Vol.22, No.6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
7. Smyth J. A., McNamee P. T. 2008. Staphylococci, streptococci and enterococci. In: Poultry Diseases, 6th Edition. Pattison M., McMullin P. F., Bradbury J. M., Alexander D. J. Ed. Saunders, Elsevier. Pp. 191-199.
8. Tarr P. E., Sakoulas G., Ganesan A., Smith M. A., Lucey D. R. 2004. Hematogenous enterococcal vertebral osteomyelitis: report of 2 cases and review of the literature. Journal of Infection 48: 354-362.
9. Teixeira L. M., Facklam R. R. 2003. *Enterococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology 8th Edition. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C. Ed. ASM Press, Washington DC, USA. Pp 422-433.
10. Wood A. M., MacKenzie G., McGillveray N. C., Brown L. 2002. Isolation of *Enterococcus cecorum* from bone lesions in broiler chickens. The Veterinary Record, 150:27.

«L'ECOLOGIA MICROBICA DIRETTA» UNA SOLUZIONE ALTERNATIVA PER IL CONTROLLO DELLA POPOLAZIONE MICROBICA CONTAMINANTE

Bertrand H.¹, Pinoia F.²

¹*Cobiotex*

²*Dox-al Italia Spa*

Studio preliminare dell'azione di un Biofilm Positivo (complesso batterico Cobiotex®) nei confronti di *S. enteritidis*, *S. typhimurium* ed *E. coli*

L'incidenza delle patologie negli allevamenti di tipo intensivo è spesso associata alla presenza di Biofilm microbici che colonizzano l'ambiente. Il Biofilm può essere definito come un insieme di cellule microbiche chiuse in un substrato di tipo polimerico di autoproduzione ed adeso ad una superficie sia di tipo biologico che inerte. Si presenta come una struttura complessa ed organizzata, nella quale sono presenti microscopici canali d'acqua intrecciati fra loro a costituire un primitivo sistema circolatorio. Alcune molecole "spia", prodotte dai microbi stessi, possono influenzarne la formazione e lo sviluppo.

La comunicazione fra le cellule è indotta da stimoli chimici che possono indurre la mutazione fenotipica delle cellule planctoniche, portandole allo stato sessile. La transizione delle cellule batteriche da una forma semplice ad un più organizzata, come quella sessile, è caratterizzata da profondi mutamenti fisiologici, indotti da stimoli ambientali e controllati geneticamente. Tali batteri sessili assumono un fenotipo particolare del tutto differente da quello dei batteri planctonici che, insieme alla matrice esopolisaccaridica in essa contenuti, li protegge dall'azione di anticorpi, fagociti ed agenti antimicrobici.

E' noto, inoltre, che certi microorganismi sono in grado di esercitare un'attività inibitrice più o meno intensa nei confronti delle altre specie microbiche. Tra essi si possono elencare *Lactobacillus* spp. e *Bacillus* spp., la cui efficacia è correlata alla produzione di batteriocine, acidi organici e bio-surfattanti che vanno ad agire sulle cellule bersaglio, modificando la permeabilità di membrana. Tali microorganismi, in certe condizioni, sono in grado di organizzarsi formando un Biofilm positivo, o associazione di microorganismi selezionati in grado di influenzare l'ecologia microbica di superficie, inibendo le flore microbiche contaminanti. Tutti i ceppi utilizzati dalla tecnologia Cobiotex non presentano alcun rischio per l'uomo, gli animali e l'ambiente.

Per rispondere alle diverse situazioni riscontrate in allevamento, è stato messo a punto un complesso con cinque ceppi del genere *Lactobacillus* e quattro del genere *Bacillus*, selezionati in base alle loro proprietà di adesione, inibizione ed enzimatiche.

Gli studi in merito all'associazione *Lactobacillus-Bacillus* hanno dimostrato l'esistenza di un'attività inibitrice nei confronti di *S. enteritidis*, *S. typhimurium* ed *E. coli*, attività riscontrata anche verso altre forme microbiche.

Una volta messo in sospensione acquosa, non contenente disinfettante attivo, il complesso Cobiotex viene applicato a tutte le superfici per nebulizzazione. Dopo l'essiccazione, viene effettuato un secondo trattamento per garantire una rapida

colonizzazione. Il Biofilm positivo si distribuisce sul Biofilm naturale (potenzialmente negativo), che aderisce direttamente alla superficie da trattare, inattivandolo. In effetti, nonostante non ci siano relazioni tra le diverse famiglie di microrganismi nella composizione degli ecosistemi locali (KJELLEBERG e Molin, 2002), tuttavia, le condizioni di allevamento a rapida successione dei cicli, per effetto di una variazione qualitativa e quantitativa degli ecosistemi microbici, possono indurre la moltiplicazione di certi ceppi patogeni, con conseguenti problematiche sanitarie negli animali. In tali situazioni, il Biofilm positivo viene utilizzato per reindirizzare la flora degli ecosistemi presenti sulle superfici. Non bisogna dimenticare, però, il ruolo che possono giocare gli altri microrganismi che vengono introdotti in allevamento. Ciò solleva, di conseguenza, la questione della durata dell'attività di un Biofilm positivo. Test effettuati in allevamenti di galline ovaiole, in cui tutte le superfici interne dei capannoni erano state trattate con il Biofilm positivo, hanno dimostrato che il complesso Cobiotech si è mantenuto attivo per tutta la durata del ciclo. L'applicazione di un Biofilm positivo in un allevamento di tipo intensivo, rappresenta una nuova frontiera per il controllo della flora contaminante, in quanto in grado di impedire l'innesto di qualsiasi altra forma microbica per diverse settimane. La ricerca per l'identificazione di ceppi con proprietà antimicrobiche, nei confronti di alcuni contaminanti, deve contribuire ad estendere l'ambito di applicazione di questi Biofilm positivi, soprattutto per l'eliminazione di eventuali forme di resistenza.



IL TUO PARTNER IN TERAPIA VETERINARIA E NUTRIZIONE



maxix 0543 21904

TECNOLOGIA BIOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DI POLLINA DI OVAIOLE (BREV. EUROPEO EP 1314710 A1): OTTIMIZZAZIONE PER CARBONIO E AZOTO

Billi L.¹, Dall'Ara A.², Golfari G.³, Massi P.⁴, Poglayen G.⁵

1. Arpa ER, Sez. Provinciale di Ravenna

3. ENEA, MATING, CR Faenza

3. Veterinario libero professionista (ex borsista SPINNER)

4. IZSLER-Sezione di Forlì

5. Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria

Riassunto

L'obiettivo è ottimizzare il contenuto di azoto e carbonio per mezzo di un trattamento biologico che supera la gestione delle deiezioni come sottoprodotto da smaltire per mezzo di un processo di igienizzazione per ottenere un fertilizzante commerciale di qualità, che migliora le caratteristiche del suolo, potenzia la fertilità e recupera verso la desertificazione.

Test sono stati condotti in allevamento intensivo su pollina disidratata con MDS (*manure drying system*) e collocata in *big bags* (bioreattori da 1 m³). E' stato stilato un piano sperimentale con la metodologia DOE (*Design of Experiments*), che è una metodologia di progettazione statistica utilizzata per descrivere un sistema biologico complesso. E' stato condotto un esperimento fattoriale completo 2² (*full factorial*), con fattori significativi l'umidità iniziale della pollina (63%, 71%, 80%) e tempo di maturazione (38, 81, 123 giorni). E' stato testato anche un trattamento in cumulo, in parallelo. I parametri di risposta sono stati TOC, TKN, anche il pH, l'umidità, la sostanza volatile e la conducibilità elettrica sono stati misurati.

Il tempo necessario per la maturazione è stato definito in base alle risposte di sanitizzazione. I risultati ottenuti hanno evidenziato come il processo di igienizzazione mantenga inalterato il tenore di carbonio e nutrienti (azoto). Il fertilizzante finale inoltre è caratterizzato da alto contenuto di carbonio, tipico di un ammendante.

Abstract

The project is an engineered system of laying hen manure (LHM) sanitation through the application of new biological technologies (bio-treatment).

The goal is to optimize nutrient and organic content by means of a biotreatment which overcomes the management of manure (livestock outputs) as waste by means of sanitation process to obtain quality marketable fertilizer, that improves the soil structure, enhances its fertility and rehabilitates for predesertification. From nutrient point of view, the purpose was to maximize nutrient (Nitrogen) and Carbon content.

Bio-Treatment tests were performed in an Intensive farming with MDS (manure drying system), inside big-bags (1 m³). The experimental planning was developed with application of Design of Experiment (DOE), that is a methodology for statistical design of an experiment used to describe a complex biological process. Full factorial 2² plan was adopted where vital factors were initial LHM humidity (60%, 70%, 80%) and maturation time (38, 81, 123 d). A comparative pile treatment was performed.

Response parameters were TOC, TKN; also pH, DM, VS and electrical conductivity were measured.

Time needed for maturation and sanitation, according to Regulation CE/208/2006, were defined. Carbon and nitrogen loss were assessed, and referred to mass losses. Because of the low effects on percentage content, sanitation bioprocess does not reduce Nitrogen and carbon content. Final fertilizer is characterized by high carbon content, enough for amendment.

Premessa: Contesto applicativo

MIDA è un progetto di ingegnerizzazione di un processo di igienizzazione delle deiezioni (tecnicamente definite pollina) delle galline ovaiole. La scelta della deiezione avicola nasce dall'elevato contenuto di azoto e fosforo (i principali nutrienti delle piante) di questo materiale.

L'obiettivo generale del progetto MIDA (*Manure Hygienisation Development and Application*) è il superamento della gestione della pollina come sottoprodotto e la necessità di disporre di suolo agricolo per la sua distribuzione, attraverso la produzione diretta di un fertilizzante di qualità con la capacità di migliorare la struttura dei terreni per una loro maggiore fertilità e un recupero della predesertificazione.

Obiettivo specifico del presente lavoro è individuare le condizioni di trattamento con una nuova tecnologia biologica che contemporaneamente ottimizzi il contenuto di carbonio e azoto nella pollina di galline ovaiole essiccata tramite MDS (*Manure Drying System*) e assicuri l'igienizzazione secondo le indicazioni contenute nel reg. CE 1774/2002 s.m.i. (Golfari *et al.*, 2010). Il contenuto di nutrienti (N e P) e/o di carbonio deve essere tale da soddisfare i requisiti previsti all'interno della normativa italiana in materia di fertilizzanti (D.lvo 217/ 2006 e s.m.i.). Il prodotto tecnico così ottenuto è un fertilizzante organico igienico e sicuro che può essere immesso sul mercato.

MIDA nasce dalla necessità di risolvere:

- 1) il costoso smaltimento della pollina in eccesso;
- 2) l'inquinamento ambientale correlato alla pollina;
- 3) la mineralizzazione troppo veloce dell'azoto;
- 4) il divieto di commercializzazione della pollina come fertilizzante a meno che non sia sottoposta ad adeguato processo igienizzante, conformemente alla normativa vigente reg. 1774/2002/CE e s. m. i., che prevede il mantenimento dello stallatico a 70 °C per almeno un'ora.

La legislazione europea e la normativa italiana (Direttiva nitrati CEE/91/676 e PUA (Piano di Utilizzo Agronomico, D. Lgs. 152/99) prevedono l'individuazione preventiva di terreni convenzionati a disposizione e l'uso delle deiezioni animali con vincoli di distribuzione di 340 kg di azoto per ettaro, ridotti a 170 nei terreni vulnerabili. Il mancato rispetto di questi limiti può portare all'inquinamento delle falde acquifere sottostanti i terreni e problemi di asfissia nel suolo. Alcune province, come ad esempio quella di Forlì-Cesena, non hanno a disposizione suolo agricolo sufficiente per il numero di animali presenti, con il rischio di ridurre la produzione di pollame.

Attualmente, in Italia, il concime è distribuito nei campi e nei terreni agricoli e interrato in pre-semina (a seconda della legislazione di cui sopra). L'azoto (elemento fondamentale per lo sviluppo e la crescita delle piante) in essa contenuto, composto ureico, mineralizza in poche settimane: è prontamente disponibile per l'inquinamento

ma non viene assorbito dalle piante, a meno che non siano caratterizzate da un ciclo di vita breve. L'utilizzo diretto di pollina costringe a tempi rapidi di interrimento e sono talvolta difficoltosi da attuare da parte degli agricoltori.

Tali vincoli valgono anche per i fertilizzanti organici. E' evidente come la possibilità di trasformare la deiezione in fertilizzante commerciale permetta di estendere l'uso ad altri terreni, andando a sostituire almeno parzialmente la fertilizzazione minerale con l'evidente vantaggio di migliorare la struttura del suolo e la ritenzione idrica della stesso e ridurre l'impatto ambientale per la produzione dei fertilizzanti.

Il raggiungimento degli obiettivi del progetto MIDA può contribuire quindi al superamento di difficoltà ambientali quali:

A) l'esaurimento materia organica nel suolo a causa della produzione intensiva con l'utilizzo di fertilizzanti sintetici, che riduce la quantità di carbonio nel suolo, provoca la compattazione dei suoli (riduzione della porosità del suolo), e riduce la ritenzione idrica dei suoli;

B) i cambiamenti climatici in corso che hanno effetto diretto sulle condizioni di produzione agricola e sul suolo stesso; queste modifiche influenzano l'intensità e la distribuzione delle precipitazioni durante tutto l'anno (periodi caratterizzati da piogge intense e frequenti sono seguiti da periodi di siccità), stressando le colture, in particolare quelle ad alto fabbisogno di acqua (mais, frutta, verdura), aumentando il rischio di erosione e frane.

Protocollo operativo

Materiali utilizzati

Nel progetto MIDA è stata testata una tecnologia italiana innovativa, sviluppata e brevettata da AMEK s. c. r. l. e CTI (EP1314710, 2002). Il brevetto si riferisce a Principi Attivi Vegetali (PAV), un preparato complesso, contenente una miscela di enzimi, biocatalizzatori preparati con piante o parti di esse. I PAV sono stati sviluppati con l'obiettivo primario di accelerare il processo di stabilizzazione aerobica della biomassa, e di conservare l'azoto in una forma a lento rilascio.

La miscela enzimatica è preparata utilizzando, come materie prime, piante appartenenti alle famiglie delle Cucurbitacee, Graminacee, Labiate, Ombrellifere e Rutacee oppure parti di esse, che sono in grado di sviluppare aromi e/o di apportare vitamine (vitamina A, E e C). Tali vegetali vengono raccolti nel loro periodo balsamico e dopo l'eliminazione di parti danneggiate o non idonee, vengono sminuzzati fino a raggiungere le dimensioni di un chicco di riso. Segue la miscelazione con liquidi naturali fino ad ottenere una poltiglia semisolida (<http://ep.espacenet.com>).

Sono individuati anche i dosaggi di impiego variabili tra 0,1 e 2 kg/m³ di substrato da trattare, dosaggi che sono funzione delle quantità da trattare.

Tipologia di pollina

E' stata impiegata la pollina essiccata tramite MDS (*Manure Drying System*) proveniente da diversi capannoni di allevamento intensivo di galline ovaiole stabulate in gabbia (Petronelli, 2008).

Tipologia di impianto

Si è previsto di testare sia la produzione di pollina direttamente in *big bag*, quindi

la confezione già pronta per la commercializzazione finale, sia in cumulo presso le tettoie di stoccaggio presenti in allevamento. La schematizzazione del sistema di produzione del fertilizzante nel suo complesso è riportata in figura 1.

La sperimentazione è stata condotta nel periodo novembre 2008 - aprile 2009.

Disegno sperimentale

I PAV sono stati testati sulla pollina di galline ovaiole per ottimizzare il contenuto di carbonio e azoto.

Il progetto è stato sviluppato tramite l'applicazione del *Design of Experiment* (DOE). Si tratta di una metodologia statistica per la progettazione di un esperimento usata per descrivere un processo biologico complesso (Montgomery, 2005). La DOE riduce il numero di esperimenti da effettuare in sistemi complessi caratterizzati da molte variabili che influenzano il processo. Il procedimento logico è riportato nella figura 2.

La fase 1 (*screening* iniziale) è stata condotta su test e prove di trattamento eseguite negli anni precedenti presso lo stesso impianto ed ha permesso di individuare grado di essiccamento iniziale della pollina (SS%) e il tempo di maturazione (t) quali fattori significativi¹ da usare come variabili di processo. E' stata effettuata la fase 2 di approfondimento, per valutare gli effetti dei fattori significativi e le loro interazioni. E' stato condotto un esperimento fattoriale completo 2^k (*full factorial*), in cui k rappresenta il numero dei fattori (2), cioè un esperimento fattoriale 2^2 con 4 punti centrali (Petronelli, 2008), come riportato in figura 3.

Le prove sono state pianificate a 38, 81, 123 giorni sulla pollina essiccata al 63%, 72%, 81%. I test sono stati eseguiti con trattamento della pollina all'interno di *big bag* (bioreattori).

E' stata inoltre eseguita la caratterizzazione della pollina all'uscita dell'MDS (t = 0). Il trattamento è stato eseguito tramite additivazione di Principi Attivi Vegetali (PAV), in un'unica soluzione, nello strato inferiore dei *big bag* durante il loro allestimento, e sul cumulo in parecchi punti verso la fine della sua formazione, al tempo t = 0. I dosaggi di impiego sono stati di 1kg per *big bag* ($\geq 1m^3$).

Nel caso del trattamento in cumulo, la sua formazione ha richiesto 4 settimane, con un volume (stimato) di 480 m³; sono stati utilizzati 90 kg di PAV additivati durante la sua formazione.

Campionamento

La procedura di campionamento è basata su istruzioni contenute nel regolamento (CE) 1774/2002 (allegato 8, capitolo 3), che indica la necessità di effettuare analisi su 5 campioni dello stesso tipo di materiale. Per ogni momento di misura, per ogni *big bag* e per il cumulo, sono stati prelevati 5 sub-campioni di circa 2 etti ciascuno, uniti e miscelati tra di loro in modo da ottenere un campione composito

1 Altri fattori quantitativi (variabili indipendenti) hanno influenza sul processo (temperatura del sistema, pH, ecc.), ma non possono essere controllati, pertanto ci si limiterà unicamente a misurarli. Vi sono, inoltre, altri fattori di tipo qualitativo (presenza di tettoia/ assenza di tettoia, sistema di gestione della pollina, tipo di impianto, estate/inverno, trattato con PAV/non trattato) che in questa fase non sono stati presi in considerazione.

per la caratterizzazione chimico-fisica. Si è scelto di aprire e vuotare completamente i sacconi per ogni prelievo. Per questo motivo sono stati allestiti i necessari *big bag*, a copertura di ogni momento del campionamento.

Per quanto riguarda il cumulo, sono stati prelevati 10 sub-campioni al di sotto della crosta, sino ad una profondità di circa 1 m.

Metodologie analitiche

Sub-campioni di pollina tal quale sono stati analizzati per la determinazione della sostanza secca (SS) e dell'azoto, sia come TKN sia come N-NH₃. L'essiccato è stato utilizzato per la determinazione del fosforo totale e delle ceneri, attraverso calcinazione (trattamento a 550°C per 2 ore, al termine del quale è stato misurato il peso). Una quota del campione è stata essiccata a 60°C per più di 12 ore (finché il peso è rimasto costante), raffinata (dimensioni <0,2 mm) ed utilizzata per le determinazioni del carbonio organico totale.

Tutte le analisi sono state realizzate conformemente ai "Metodi ufficiali di analisi del compost" (ANPA, 2001); N-NH₄ e il fosforo totale sono stati determinati secondo "Metodi di analisi dei fertilizzanti" (Trinchera et al., 2006).

Risultati e Discussione

I risultati della determinazione del carbonio nella prova sperimentale in *big bag* sono riportati in tabella 1. E' evidente in primo luogo l'omogeneità dei dati relativi alla pollina all'uscita del sistema MDS, in cui solo il campione relativo ai *big bag* 11 e 6 sono di poco inferiori agli altri, e comunque tutti ≥ 30 . I risultati evidenziano la sostanziale tenuta della concentrazione di carbonio lungo tutto il periodo di trattamento.

I risultati della caratterizzazione del contenuto di azoto, misurato come TKN, è riportato in tabella 2; in primo luogo essi evidenziano una certa variabilità nelle condizioni iniziali, rappresentano la variabilità della concentrazione di azoto all'interno della pollina (essi non rappresentano una unica popolazione statistica); apparentemente, la variabilità iniziale sembra ridursi, come se il trattamento portasse ad una omogeneizzazione del sistema; tale verifica richiede una analisi più dettagliata.

La caratterizzazione dell'evoluzione del cumulo è riportata in tabella 3. Anche in questo caso si possono ripetere le osservazioni appena fatte per carbonio ed azoto; in questo caso si evidenzia anche fenomeno di essiccamento dello stesso.

Considerazioni

Le analisi chimiche effettuate da ARPA-ER, Sez. Provinciale di Ravenna, hanno evidenziato la congruenza dei parametri azoto, fosforo e carbonio con la normativa sui fertilizzanti (D. Lgs. 217/06 e s.m.i.). Infatti, le misure di fosforo hanno mostrato una concentrazione in tutti i campioni superiore al 2% come P₂O₅, consentendo quindi al prodotto finale di avere le caratteristiche tali da poter essere considerato un fertilizzante (concime organico NP, pollina essiccata) ai sensi del suddetto decreto.

Per la pollina di galline ovaiole, allevate in gabbia, il contenuto di carbonio, così come di nutrienti (N e P), dipende in primo luogo dalla dieta e in seconda istanza dal sistema di gestione della pollina. Per carbonio ed azoto hanno poi importanza fondamentale i processi di maturazione, che spesso portano ad una loro perdita

per volatilizzazione rispettivamente come CO₂ e come ammoniaca, soprattutto per polline umide.

In questo caso specifico si è notata una sostanziale tenuta sia per il tenore di carbonio organico che di azoto totale nel periodo di osservazione di 120 giorni.

Un'ulteriore considerazione è che il tenore di carbonio è molto alto nei *big-bag*, pari o superiori al 30% , che rappresenta la soglia richiesta per l'ammendante organico letame avicolo.

Queste prime incoraggianti considerazioni richiedono ulteriori valutazioni sia in applicazione al modello statistico sia in termini di ottimizzazione dei bilanci di massa.

Bibliografia

1. Amek e CTI, 2002. "Processo di maturazione e stabilizzazione di biomassa per ridurre le emissioni maleodoranti" EP 1314710 A1(<http://ep.espacenet.com>)
2. ANPA, 2001. "Metodi ufficiali di analisi del compost". ANPA, Manuale n.3.
3. Golfari *et al.*, 2010. "Tecnologia biologica per il trattamento di pollina di ovaiole: Progetto MIDA di sanitarizzazione" SIPA 2010.
4. Montgomery D.C., 2005. "Design and Analysis of Experiments" VI ed., John Wiley & Sons, New York
5. Petronelli, 2008. "Stabilizzazione e utilizzazione della pollina ai fini agronomici" Tesi di laurea Specialistica in Ingegneria Chimica. A.A. 2007/2008. Università di Bologna
6. Trinchera *et al.*, 2006. "Metodi di analisi dei fertilizzanti" MIPAF.

Ringraziamenti

Si ringraziano le aziende AMEK (Ferrara) e Coop. Trasporti Imola (CTI, Imola, BO) per avere contribuito alla sperimentazione con l'utilizzo della loro tecnologia e il gruppo EUROVO per aver permesso e contribuito alla sperimentazione nei suoi allevamenti.

Figura 1. Schema a blocchi del processo di produzione del fertilizzante.

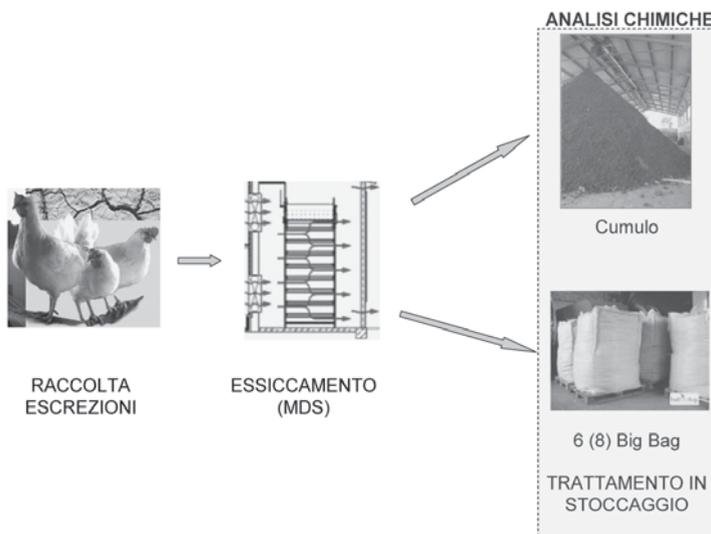


Figura 2. Schema del disegno sperimentale.

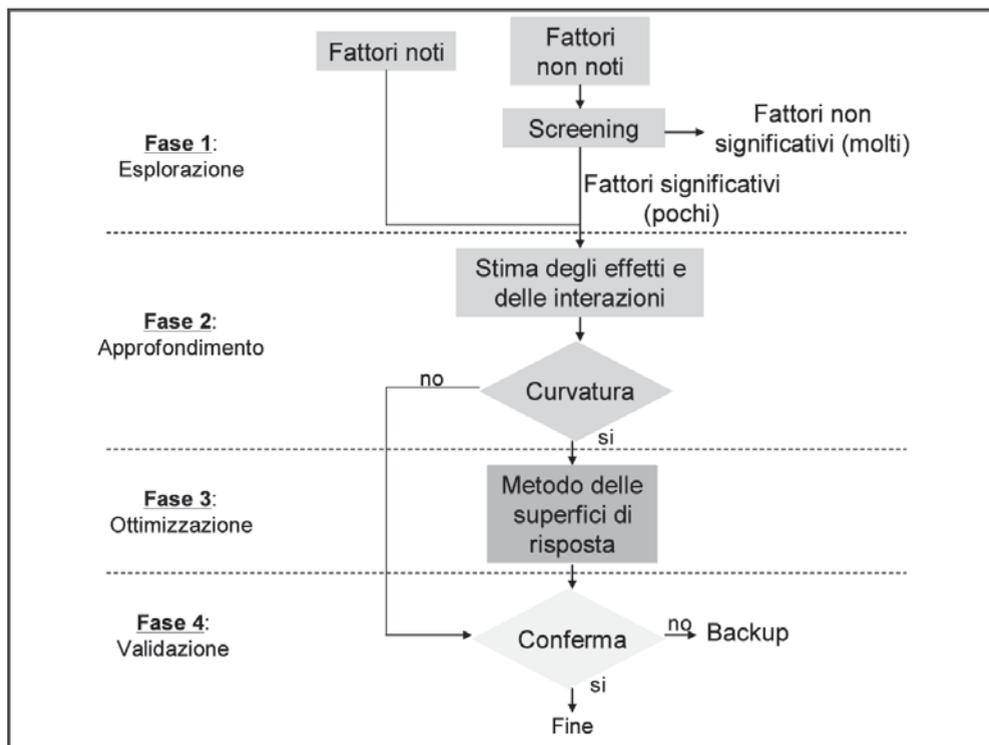


Figura 3. Schema sperimentale utilizzato.

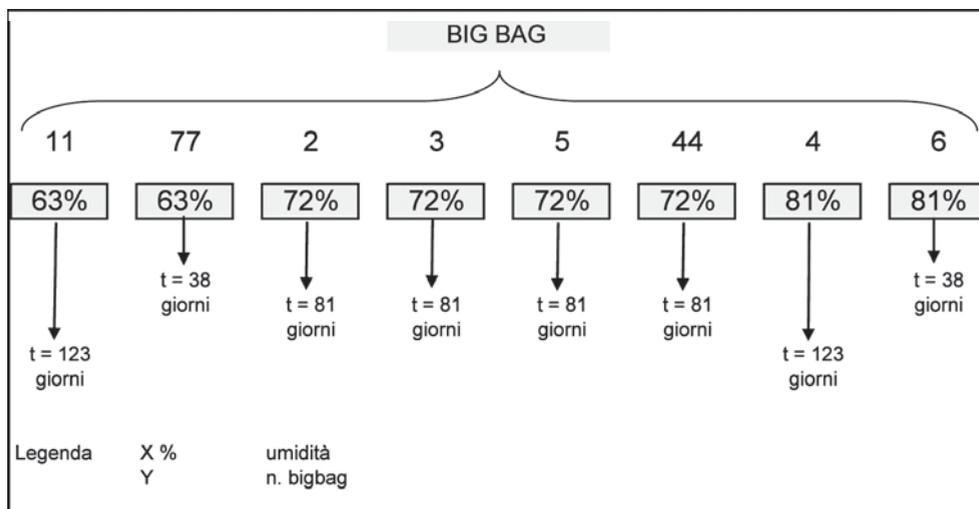


Tabella 1. Risultati della determinazione del TOC nel corso della sperimentazione (% SS).

% S.S. iniz.	SACCO	B (t = 0)	C (t = 38 g)	D (t = 81 g)	E (t = 123 g)
63,2 ± 1,6	11	30,3			32,3
“	77	33,3	33,4		
71,7± 5,1	2	33,5		35,1	
“	3	33,1		30,8	
“	44	33,3		32,1	
“	5	32,2		30,0	
81,1 ± 4,2	4	33,1			31,8
“	6	30,0	28,8		
Valor medio	-	32,4 ± 1,4			

Tabella 2. Concentrazione di azoto totale misurato come TKN (% sul tal quale).

% S.S. iniz.	SACCO	B (t = 0)	C (t = 38 g)	D (t = 81 g)	E (t = 123 g)
63,2 ± 1,6	11	1,91			3,12
	77	2,64	2,48		
71,7± 5,1	2	2,91		3,3	
“	3	2,91		2,94	
“	44	2,64		4,21	
“	5	3,17		3,01	
81,1 ± 4,2	4	3,42			3,04
“	6	2,2	2,32		
valor medio	-	2,72 ± 0,46			

Tabella 3. Evoluzione del cumulo.

Parametri.	Unità di misura	B (t = 0)	C (t = 38 g)	D (t = 81 g)	E (t = 123 g)
SS	%	53,3	66,4	70,0	79,1
pH		8,78	7,85	n.d.	7,98
TOC	% SS	31,3	29,5	29,5	29,9
TKN	%	2,66	3,14	3,58	3,27

TECNOLOGIA BIOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DI POLLINA DI OVAIOLE (BREV. EUROPEO EP 1314710 A1): VALUTAZIONE ECONOMICA DELLA PRODUZIONE *IN SITU* DEL FERTILIZZANTE

Bonoli A.¹, Dall'Ara A.², Gagliardi S.³, Golfari G.⁴, Massi P.⁵, Nonni S.¹, Poglayen G.⁶

1. *Università di Bologna, Facoltà di Ingegneria, DICAM*

2. *ENEA, MATING, CR Faenza*

3. *ASSOAVI, Forlì*

4. *Veterinario libero professionista (ex progetto SPINNER)*

5. *IZSLER-Sezione di Forlì*

6. *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria*

Riassunto

Vengono riportate le valutazioni tecniche ed economiche relative alla trasformazione di pollina di ovaiole stabulate in gabbia in un prodotto (fertilizzante) commerciale di qualità tramite un processo brevettato in Italia ed in Europa. I risultati relativi agli effetti di igienizzazione e di conformità alle normative sui fertilizzanti sono riportati in lavori paralleli. Scopo del progetto è rendere la pollina una fonte di guadagno per l'allevatore ed una fonte di risparmio per l'agricoltore (utilizzatore finale).

I sottoprodotti sono trasformati in prodotti commerciali direttamente presso l'allevamento (*on farm*), mediante sistemi semplificati che assicurano l'igienizzazione; per contenere i costi, tutte le operazioni non necessarie sono minimizzate, ad es. non si prevede la pellettizzazione e in alcuni casi neanche il confezionamento.

Il VAN (valore attuale netto) è il metodo utilizzato per valutare la convenienza economica per l'allevatore, che può essere anche il produttore del fertilizzante. Sono analizzati due *step*: i) la vendita della pollina allo stato sfuso (alla rinfusa); ii) la vendita del prodotto confezionato in *big bag*. In entrambi i casi sono state esaminate le soluzioni distributive B2C (vendita diretta al consumatore) e B2B (vendita attraverso distributore). Nel caso di vendita di pollina allo stato sfuso, i VAN in entrambi i casi (B2C e B2B) sono positivi, pertanto il progetto può essere considerato conveniente per l'allevamento. Nel secondo si registrano VAN positivi, ma di importo molto limitato.

Abstract

The technical and economical viability of converting laying hen manure in a marketable organic fertilizer by means of a patent pending process is approached. The aim of the project is to make LHM a source of profit both for the breeder and for the farmer, looking toward the sustainable development.

By-products are transformed in marketable products (organic fertilizer), directly on-farm, with a streamlined process, which assure sanitation. The not necessary operations are minimized: for example no pellettization and no packaging, like compost.

The method used to check the economic convenience which derives from the new fertilizer production for the manufacturer, the LHM breeder, is the net present value (NPV). Two steps are analysed: i) the sale of unpacked products ii) the sale of unpacked and packed products (*big bag*). In both cases two different distribution

solution are examined: B2C and B2B.

Finally the economic convenience which derives from the use of the product for the farmer is approached. For unpacked fertilizers, NPV values are positive both for B2C e B2B, leading to a profitable project for poultry farmer. In case of unpacked and packed products NPV values are still positive, even if lower.

Premessa

L'obiettivo del progetto complessivo è la produzione di un FNS (Fertilizzanti Non di Sintesi), con i vantaggi di trasformare il sottoprodotto Pollina in un materiale commerciale di qualità, a norma rispetto alla legislazione sui fertilizzanti ed igienicamente sicuro.

A tutt'oggi gli allevamenti gestiscono le deiezioni prodotte dalle galline, consegnandole gratuitamente ad agricoltori convenzionati. Pertanto tale attività non rappresenta, ancora un business per l'allevamento, ma comporta addirittura dei costi (trasporto della pollina all'agricoltore).

Con la produzione del fertilizzante di qualità si abbandonerà completamente tale strategia per adottare quella di trasformare la totalità delle deiezioni in un fertilizzante commercializzabile presso lo stesso allevamento (*on farm*) con lo scopo di ottenere sostanzialmente un ricavo.

L'obiettivo è la ricerca di una soluzione che, con un minimo investimento economico da parte dell'allevamento, permetta la produzione del nuovo prodotto. Successivamente, se l'allevamento constaterà l'effettiva convenienza economica derivante dalla produzione e commercializzazione della pollina PAV, potrebbe decidere di effettuare ulteriori investimenti, anche più consistenti, per ampliare il mercato del prodotto e automatizzare il processo produttivo. Pertanto si prevede una crescita per *step* del business presso l'allevamento, con diverse fasi che evolveranno progressivamente nel tempo, ognuna caratterizzata da investimenti diversi.

Si riportano i risultati di una situazione specifica, in cui si è studiata l'applicazione del trattamento descritto nel brevetto EP 1314710 A1 (Amek e CTI, 2002) ad un allevamento di galline ovaiole con sistema MDS di essiccamento della pollina, prendendo come riferimento una tettoia di stoccaggio del materiale (denominata tettoia A), così come descritto in Golfari *et al.* (2010).

- Per una convenienza economica del progetto, si è previsto il trasporto del prodotto pollina PAV sino ad una distanza massima di 100-150 km dal centro di produzione, in modo da mantenere dei costi di trasporto ridotti potendo parlare così di una produzione a "km 0".

Per quanto riguarda la valutazione economica del progetto, si vuole assumere un'ottica di intera filiera. Prendendo in considerazione prodotti di primo livello, il catalizzatore biologico PAV, prodotti di secondo livello, i fertilizzanti, e i sistemi di applicazione innovativi adottati per entrambe le tipologie di prodotti, si è cercata un'ottimizzazione dell'intera filiera. Quindi si valuterà la convenienza economica derivante dalla realizzazione del nuovo prodotto pollina PAV per il produttore del fertilizzante (gli allevatori di galline ovaiole) e si introdurranno alcuni aspetti economici che riguardano anche l'utilizzatore finale del prodotto, l'agricoltore (*end-user*).

Protocollo operativo

Lo studio di fattibilità prevede l'analisi del processo produttivo che dovrà essere realizzato nell'allevamento per produrre la pollina PAV. Sono state analizzate: il nuovo processo nelle sue varie fasi e il suo sviluppo nel tempo, il susseguirsi delle attività necessarie e le loro tempistiche, la quantità di fertilizzante che si stima di poter realizzare nell'arco di tempo considerato. Si considerano le modifiche da apportare all'attuale processo di gestione delle deiezioni, utilizzato nell'allevamento, e quindi gli investimenti da attuare per la produzione del fertilizzante a partire dalle deiezioni. Successivamente, attraverso metodologie di natura finanziaria, si è valutata la convenienza economica del progetto. La valutazione degli investimenti in innovazione (realizzazione di un nuovo prodotto) presenta difficoltà specifiche rispetto agli altri investimenti industriali, come l'incertezza sui rendimenti attesi o sulla risposta del mercato.

Il metodo utilizzato è il VAN (Valore Attuale Netto), che permette di capire se gli esborsi o gli incassi effettuati durante tutta la vita del progetto determinano complessivamente un guadagno o una perdita, riportando i valori economici al tempo zero (ossia al momento in cui si esegue la valutazione) (Fontana e Caroli, 2006).

Un qualsiasi progetto di investimento produce flussi di cassa in entrata ed in uscita in un dato orizzonte temporale. In linea generale, il suo valore dovrebbe essere funzione di 4 variabili:

- l'ammontare dei flussi di cassa;
- il momento in cui sono disponibili tali flussi di cassa;
- la durata dell'investimento;
- il costo opportunità del capitale impiegato per finanziare l'investimento (rappresentato dal tasso di rendimento atteso da un investimento sul mercato finanziario che presenta uguale rischiosità). Il metodo del VAN si basa su queste 4 variabili, come tutti i metodi che utilizzano i Flussi di Cassa Scontati (*Discounted Cash Flows*, DCFs). Il VAN, in particolare rispetta il principio del valore finanziario del tempo, che penalizza i flussi più distanti a favore dei più recenti rispetto al momento di valutazione del progetto. Il fattore di attualizzazione dei flussi di cassa si esprime in funzione del costo opportunità del capitale (r):

$$i = 1 / (1+r)$$

Questo fattore permette di esprimere valorizzati all'anno zero i flussi di cassa generati dall'anno 1, scontandoli di un anno ($F_0 = F_1 * i$).

Per investimenti della durata di N anni si deve procedere con una somma dei flussi di cassa moltiplicati ognuno per il fattore di attualizzazione relativo all'anno di competenza. Si ottiene quindi una somma su un indice temporale incrementale t , attraverso la quale si rappresenta una sorta di bilancio tra voci positive (incassi) e negative (esborsi):

$$VAN = \sum_{t=0}^N \frac{F_t}{(1+r)^t}$$

F_t = flusso di cassa netto (incassi – esborsi) all'anno t ;

N = vita economica del progetto.

Nel calcolo del VAN si fa riferimento ai flussi di cassa di tipo operativo ed incrementale, ossia che derivano dall'implementazione del progetto e non sarebbero presenti se il progetto non venisse attuato.

Dal risultato della formula si ottiene un valore positivo o negativo.

In ogni caso, se il VAN è positivo il progetto è economicamente valido, perché il bilancio complessivo valorizza maggiori incassi rispetto agli esborsi (ovviamente attualizzati). La condizione di accettazione diventa quindi molto semplice: $VAN > 0$.

Si prende in considerazione un singolo caso reale: l'allevamento di galline ovaiole di Mordano (BO) ed in particolare il trattamento della pollina prodotta da 320.000 galline stabulate in 3 ricoveri/stabilimenti collegati tramite nastri trasportatori a MDS (*Manure Drying System*), sistemi di essiccamento spinto delle deiezioni. Queste ultime sono inviate sempre mediante nastri trasportatori ad una tettoia di stoccaggio delle deiezioni in cumuli. Nella tettoia è possibile creare tre cumuli.

Risultati

a) Processo produttivo

Nel primo *step* si prevede di produrre unicamente pollina PAV sfusa, che una volta pronta verrà caricata su camion e trasportata all'agricoltore. Si assume di realizzare nel capannone di stoccaggio cumuli da 410 tonnellate di pollina l'uno (circa 680 m³), con tempo di realizzazione di 45 giorni tempo di maturazione di 120 giorni; nel frattempo si passerà alla formazione del secondo e poi del terzo cumulo. La produzione finale del fertilizzante da ciascun cumulo sarà pari a 328 [t/cumulo], tenendo conto delle perdite per mineralizzazione ed evaporazione dell'acqua che avvengono durante i 120 giorni di maturazione e pari al 20% (fattore f).

Il processo produttivo è rappresentato in figura 1. Nel primo anno si hanno 2 cicli di produzione (realizzazione di 6 cumuli in totale), ma solo una commercializzazione (dei primi 3 cumuli realizzati); il secondo anno, invece, si avrà un solo ciclo di produzione, ma 2 fasi di commercializzazione (vendita dei 3 cumuli realizzati nell'anno precedente e dei 3 realizzati nell'anno in corso). Si può ipotizzare che questa situazione, caratterizzante i cicli di produzione e commercializzazione in 2 anni, si ripeterà ciclicamente nel tempo; nel prosieguo quindi si esprimeranno i valori medi per ciascun anno.

b) Investimenti necessari

Il primo *step* è caratterizzato dal minimo investimento possibile che l'impresa può realizzare per la produzione della pollina PAV ed è quindi quello che presumibilmente attueranno inizialmente gli allevamenti. In questo caso si prevede di:

- Realizzare un'apertura posteriore nel capannone (vedi figura 1.5) che permetta di accedere al terzo cumulo; per ora, infatti, il capannone, di forma rettangolare, è aperto solo anteriormente. L'apertura permette l'accesso diretto e indipendente al terzo cumulo al fine di migliorare il processo dal punto di vista sia logistico sia temporale.
- Installare nel capannone tre pareti mobili in PVC, una presso l'apertura anteriore, per riparare il cumulo sia da eventuali contatti secondari esterni sia dalle intemperie, e due fra i cumuli di pollina all'interno del capannone (una fra il primo e il secondo

e una fra il secondo e il terzo) per ridurre al minimo le interazioni fra i cumuli, dovute in particolare alla volatilizzazione delle polveri di pollina e il rischio di (ri) contaminazione dei cumuli. La fase di maturazione della pollina necessita un'adeguata aerazione del cumulo, assicurata dalle aperture laterali presenti nel capannone.

Le pareti mobili saranno ancorate al soffitto; saranno azionate tramite motori elettrici, azionabili tramite apposito pulsante, che consentirà la discesa al suolo e il recupero della membrana in PVC (Nonni, 2009). Queste pareti in PVC saranno inoltre facilmente lavabili, operazione necessaria per motivi igienici e di contaminazione.

Si prevede l'installazione di zanzariere (prevalentemente contro le mosche) su tutte le aperture laterali e posteriori, al di sopra dei muri, in modo da isolare il capannone dall'esterno, permettendo tuttavia una certa aerazione. Il prospetto degli investimenti è riportato in tabella 1.

c) Costi operativi

- **Manodopera:** un operaio specializzato che per mezza giornata (*part-time*) si occupi di tutte le attività che riguardano la produzione della pollina PAV:
 - inserimento manuale dei “panetti” PAV nel cumulo; tale attività verrà ripetuta circa 3 volte per ogni cumulo dall'operatore, con una durata complessiva per ognuna di esse di circa 20 minuti;
 - assistenza nel controllo della qualità della pollina PAV, attuando i campionamenti richiesti;
 - controllo del funzionamento dei nastri trasportatori;
 - movimentazione del sistema di pareti mobili;
 - gestione del caricamento della pollina PAV sui camion;
 - lavaggio e igienizzazione delle pareti mobili circa 2 volte all'anno.
- **Manutenzione e consumi energetici,** dovuti all'utilizzo dei motori elettrici collegati alle pareti mobili (azionati presumibilmente solo 2 volte in un anno)
- **Trasporto:** il trasporto del fertilizzante all'agricoltore sarà un servizio offerto dall'allevamento nel caso B2C e sarà incluso nel prezzo del prodotto stesso.

Si può stimare una tariffa media di trasporto per il materiale sfuso pari a **12,50 €/t**, in considerazione di un raggio di distribuzione del prodotto non superiore ai 100-150 km (approssimazione accettabile). Si utilizzano camion che trasportano circa 16 tonnellate di materiale sfuso.

Nel caso B2B invece non si considera il trasporto come servizio fornito dall'allevamento poiché molto spesso i consorzi agricoli sono convenzionati con cooperative di trasporto che si occuperanno di tale attività. Se eventualmente il commerciante richiederà tale servizio, glielo si potrà offrire modificando il prezzo richiesto.

Per quanto riguarda la quantità di materiale da trasportare all'anno, come visto precedentemente, varierà: un anno vi sarà la necessità di trasportare solo 3 cumuli e un anno 6. Per determinare una quantità annuale valida per qualsiasi anno considerato si ipotizza di considerare la media delle due quantità. Per cui nell'anno in cui si commercializzano solo 3 cumuli, la quantità totale trasportata sarà : $328 * 3 = 984$ t; mentre nell'anno in cui si commercializzano 6 cumuli trasporteremo: $328 * 6 = 1968$ t. La media delle due quantità è : **1476 t**. Questo è il valore utilizzato per la quantità di pollina commercializzata (e quindi trasportata) all'anno. Sicuramente è un'ipotesi abbastanza forte il considerare questo valore medio, ma ciò permette di semplificare

la successiva valutazione economica del progetto. Il costo totale di trasporto sarà:
 $12,50 * 1476 = 18.450 \text{ €/anno}$.

E' necessario considerare anche il fatto che l'allevamento già prima dell'attuazione del progetto sosteneva dei costi di trasporto per portare la pollina gratuitamente all'agricoltore. Si può stimare che la quantità di pollina trasportata fosse uguale a quella calcolata precedentemente: 1476 t/anno (stima cautelativa) e che il prezzo del trasporto fosse di 8 €/t (minore di 12,5 €/t, prezzo considerato per il progetto, poiché la distanza media percorsa era minore e si utilizzavano altre tipologie di mezzi per il trasporto). Perciò, dato che per la valutazione di un progetto tramite il metodo del VAN si considerano unicamente i costi differenziali, cioè attribuibili esclusivamente all'attuazione dell'investimento, per ottenere il costo di trasporto differenziale, al costo di trasporto calcolato per il progetto dovremmo sottrarre il costo di trasporto che già prima dell'avvio del business era sostenuto dall'allevamento: **6.642 €/anno**. Nel caso B2B, come già detto, il servizio di trasporto non è fornito, ma bisogna tenere in considerazione che, grazie all'attuazione del progetto, l'allevatore non sosterrà più i costi di trasporto per la consegna gratuita della pollina all'agricoltore pari a **11.808** ($8*1476$). Questo perciò rappresenta un costo che non verrà più sostenuto grazie alla realizzazione del progetto (quindi tale valore verrà sottratto ai costi totali sostenuti).

- **PAV**: il prezzo commerciale non è definito; si introduce una stima di 290 €/kg. Per quanto riguarda la quantità di pollina trattata all'anno, come visto precedentemente, varierà: un anno si realizzeranno 6 cumuli e un anno 3. Per determinare una quantità annuale valida per qualsiasi anno considerato, si ipotizza di valutare (comprendere?) la media delle due quantità: **1845 t/anno**.

Per l'anno in cui si realizzeranno 6 cumuli, la quantità totale trattata sarà : $410 * 6 = 2460 \text{ t}$; mentre nell'anno in cui si produrranno solo 3 cumuli tratteremo: $410 * 3 = 1230 \text{ t}$.

Considerato che per la pollina sfusa si usano 0,3 kg/t di PAV, in totale si utilizzeranno $0,3 \text{ [kg/t]} * 1845 \text{ [t/anno]} = 553,5 \text{ [kg/anno]}$ di PAV, con un costo di 11.070 €/anno. Nella tabella 2 sono riportati i costi operativi nel loro complesso.

d) Costi generali

Tali costi comprendono la quota di iscrizione al Registro dei fertilizzanti e dei fabbricanti di fertilizzanti e quelli per l'esecuzione di analisi chimiche (azoto, fosforo, ...), igieniche (*E. Coli, Salmonella, Enterococcaceae, Enterococcus faecalis, ...*) e di controllo del prodotto finale.

- **Costi aggiuntivi per la gestione amministrativa e**, solo nel caso B2C, per la **gestione commerciale del progetto**. Nel B2C una valida soluzione può essere quella di assumere un collaboratore con un contratto a progetto che svolga tali attività. Questa tipologia di contratto permette sia un vantaggio fiscale per l'azienda sia un'elevata responsabilizzazione della persona assunta, a cui si daranno obiettivi periodici da raggiungere inerenti il progetto, e che si dedicherà unicamente ad esso. Si stima un costo di **18.000 €/anno**.

Nel B2B, dove la commercializzazione del prodotto è gestita da terzi e perciò vi sarà la necessità di effettuare unicamente l'**attività amministrativa**, si ipotizza sia necessario un dipendente che si occupi della gestione amministrativa di tutti e tre i capannoni di stoccaggio. Perciò si avrà un costo di manodopera totale di 30.000 €/

anno da allocare sui tre capannoni, con un costo per ognuno di **10.000 €/anno**. Sono stati inoltre previsti sia costi per la costruzione del marchio di qualità, di origine controllata, in grado di garantire le caratteristiche distintive del prodotto e sua registrazione in Italia sia costi promozionali per:

- pubblicazioni su riviste specializzate;
- realizzazione di opuscoli informativi;
- partecipazione ad iniziative locali e fiere di settore;
- prove gratuite.

Nella tabella 3 sono riassunti i costi generali nel loro complesso.

e) Ricavi

Innanzitutto si ipotizza, date le modeste quantità, che il prodotto verrà venduto totalmente e non ci saranno rimanenze.

Come prezzo della pollina PAV sfusa si utilizza quello stimato in Nonni (2009), di 85 [€/t] nel caso B2C, in cui è compreso anche il trasporto e 60 [€/t] nel caso 2B.

Si assume come quantità commercializzata all'anno il valore medio stimato precedentemente: 1.476 t.

I ricavi annuali sono riportati in tabella 4.

f) Prospetto del VAN

Le ipotesi assunte come riferimento per l'esecuzione del VAN sono riportate in tabella 1. Per la compilazione del prospetto del VAN sono necessarie voci di costo e ricavi relativi alla gestione operativa, ma anche alla gestione straordinaria, considerando gli investimenti in immobili e impianti che possono generare ammortamenti.

Le variazioni del capitale circolante, in considerazione che non si prevedono scorte e i costi sono trascurabili, non verranno conteggiate.

L'aliquota di imposta ipotizzata è pari al 50%.

Si analizzano nello specifico le due opzioni B2C (Tabella 6) e B2B (Tabella 7) esplicitando tutti i flussi di cassa attualizzati nei 5 anni previsti come orizzonte temporale del progetto.

Per la costruzione del VAN si è utilizzato un costo per il PAV di 20 €/kg (prezzo minimo). Attraverso una serie di prove, si può osservare che anche se il prezzo del PAV aumentasse a 25 o 30 €/kg, il VAN del progetto (sia nel caso B2C che nel B2B) rimarrebbe comunque positivo.

g) Step II

Nel secondo *step* si ipotizza, oltre alla produzione della pollina PAV sfusa (nelle stesse quantità e con lo stesso processo visto nel caso precedente), anche la realizzazione e commercializzazione di fertilizzante confezionato in *big-bag*. La pollina, trasportata dai nastri, verrà inserita direttamente all'interno dei *big-bag* dove, dopo 120 giorni di maturazione, diverrà fertilizzante commercializzabile. Il processo produttivo è rappresentato in figura 2, simile a quello visto precedentemente.

Si ricorda che i cumuli realizzati nel capannone sono da 410 t ciascuno e che occorrono 45 giorni per la formazione di ognuno.

La realizzazione dei *big-bag* permette di eliminare il problema riscontrato nel caso precedente. Infatti, le 886 tonnellate di pollina "buona" che nello *step* 1 venivano consegnate gratuitamente agli agricoltori perché non c'era posto nel capannone

per stoccarle, ora vengono inserite nei *big-bag* dove matureranno e diverranno fertilizzante. I rettangoli rosa rappresentano i periodi in cui la pollina presenta caratteristiche per cui non è utilizzabile per la produzione del fertilizzante (pollina troppo umida, vedi § 1.3) e quantificabili in 37 giorni totali all'anno (stima: 329/9); i rettangoli arancioni, invece, rappresentano i periodi di produzione dei *big-bag*.

Considerando *big-bag* da 600 kg l'uno, dato che in un giorno al capannone arrivano 9 t di pollina, il numero di *big-bag* realizzabili sarà 15 *big-bag* al giorno.

Il primo anno si realizzano *big-bag* in un solo periodo di 53 giorni e perciò $15 \cdot 53 = 795$ *big-bag* all'anno; il secondo anno invece si realizzano *big-bag* in 2 periodi, per un totale di 143 giorni/anno, in cui verranno realizzati $15 \cdot 143 = 2.145$ *big-bag*. Dato che l'andamento della produzione di *big-bag* si ripete in tal modo ogni 2 anni, si può stimare un'unica quantità di *big-bag* realizzati valida per ogni anno, attraverso una semplice media delle due quantità. Con tale media si stimano 1470 *big-bag* all'anno, che dovranno essere stoccati all'interno di un magazzino. Per quanto riguarda la quantità di PAV per tonnellata di pollina da utilizzare per i *big-bag*, è maggiore rispetto al caso sfuso: in un *big-bag* da 600 kg si inseriscono 0,8 kg di PAV.

Con riferimento ai costi, il secondo *step* comporterà ulteriori investimenti che consentiranno di ampliare il mercato del prodotto pollina PAV, di avere un magazzino, con merce sempre pronta alla consegna e di eliminare i problemi organizzativi riscontrati nel caso precedente.

I maggiori investimenti sono connessi:

- acquisto di una macchina riempitrice per *big-bag* che consenta di realizzare dei *big-bag* da 600 kg di pollina. La pollina dovrà poi maturare all'interno di essi per 120 giorni prima di poter essere commercializzata, per garantire la qualità e l'igienizzazione;
- realizzazione di un **magazzino** in cui stoccare i *big-bag*; il magazzino è indispensabile poiché i *big-bag* necessitano di maturare per 120 giorni in un luogo coperto prima di poter essere commercializzati.

Le ipotesi assunte come riferimento per l'esecuzione del VAN sono riportate in tabella 8 (riferite sempre alla sola tettoia A).

Come in precedenza le variazioni del capitale circolante, non considerando scorte e costi sono approssimative, pertanto non verranno conteggiate.

Anche l'aliquota di imposta ipotizzata si mantiene al 50%.

Ora si analizzano nello specifico le due opzioni B2C (Tabella 9) e B2B (Figura 2.10) esplicitando tutti i flussi di cassa attualizzati nei 7 anni previsti come orizzonte temporale del progetto. Per la costruzione del VAN si è utilizzato, come nel caso precedente, un costo per il PAV di 20 €/kg e dosi di impiego del PAV di 0,8 kg per *big bag* per tenere conto delle dimensioni ridotte del materiale trattato.

Considerazioni

La valutazione presentata rappresenta un approccio preliminare particolarmente utile per fornire indicazioni pratico/operative.

La teoria economica sostiene che il prospetto previsionale del Valore Attuale Netto rappresenti il metodo più rigoroso e attendibile per la valutazione di un investimento. Nel caso in cui il VAN sia maggiore di 0 il progetto considerato dovrebbe essere accettato perchè produce vantaggio economico. Analizzando i VAN dello *step* 1, si può notare che in entrambi i casi (B2C e B2B) essi siano positivi, perciò il progetto,

inerente la sola produzione di pollina PAV sfusa, è conveniente per l'allevamento. Anche nel caso di vendita anche del prodotto confezionato in *big bag*, si hanno VAN positivi, ma di importo molto limitato; il limite principale è rappresentato dai costi del capannone di stoccaggio dei *big bag*.

Per la valutazione economica dei progetti si è considerata la situazione più sfavorevole, che pertanto è sicuramente migliorabile, infatti:

- invece di 120 giorni di maturazione si potrebbe passare a 90 giorni, in base a nuovi studi sul processo di igienizzazione; ciò permetterebbe sia di ridurre i tempi morti nel processo produttivo sia di ridurre le perdite per mineralizzazione durante la maturazione. Ciò consentirebbe quindi di aumentare la quantità commercializzata di pollina PAV sfusa (la più conveniente) e il peso e quindi il prezzo dei singoli *big bag*;
- è stato assegnato al prodotto un prezzo “basso”, che non rispecchia esattamente le sue qualità come fertilizzante (in particolare la presenza di N organico a lento rilascio) e che quindi, nella realtà, potrebbe essere più alto.

Quindi si può notare come la situazione produttiva possa solo migliorare rispetto a quella analizzata, con un conseguente aumento dell'importo dei VAN.

Oltre ad una valutazione puramente economica è importante sottolineare come la messa a punto di un materiale naturale, derivante dall'utilizzo di sottoprodotti organici e ricco di sostanze nutritive per i suoli, offre un nuovo valido strumento alle comunità mondiali per la lotta all'impoverimento della fertilità dei suoli e alla desertificazione, problematica che coinvolge non soltanto i paesi in via di sviluppo, ma anche le nazioni industrializzate, che sempre di più dovrebbero impegnarsi a preservare le proprie risorse naturali, piuttosto che orientarsi al loro sfruttamento intensivo, alterando così l'equilibrio consumo-rigenerazione dell'ecosistema terrestre

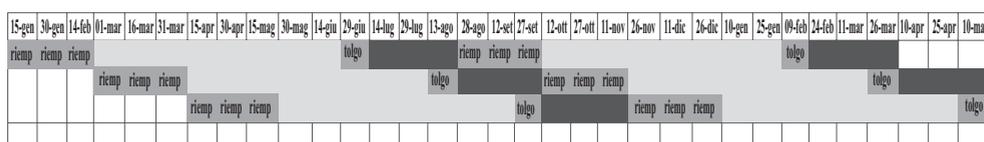
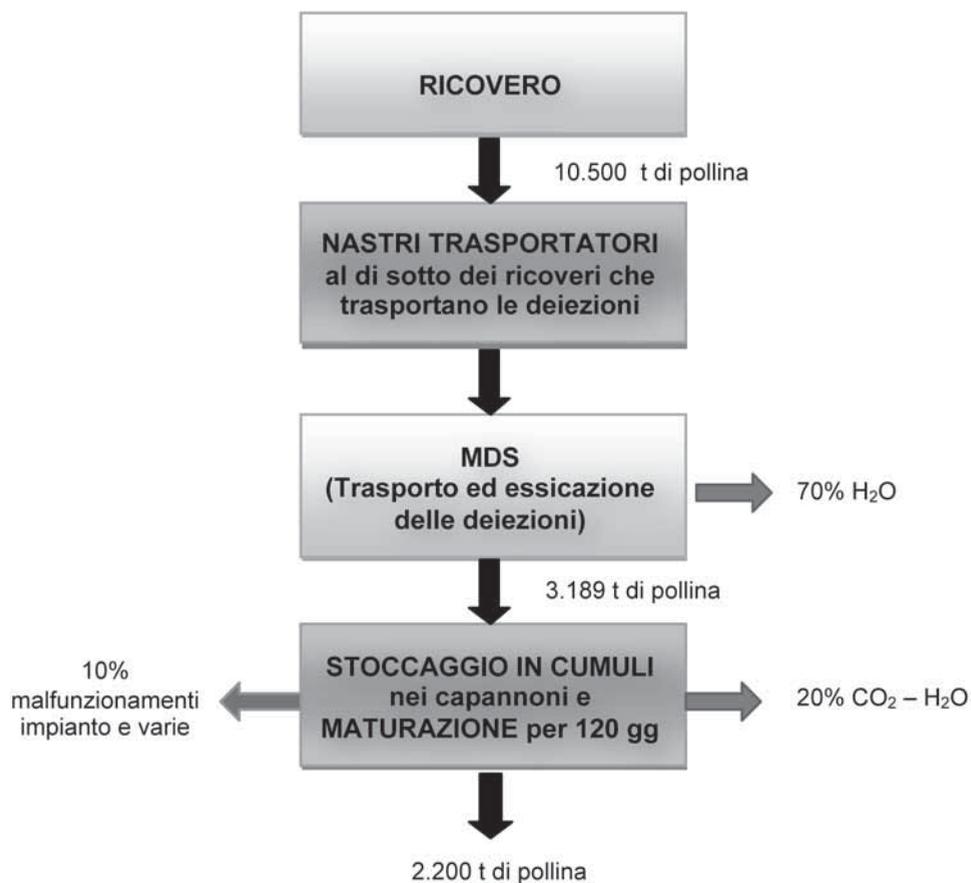
Bibliografia

1. AMEK e Coop. Trasporti Imola, 2002. “Processo di maturazione e stabilizzazione di biomassa per ridurre le emissioni maleodoranti”, EP1314710 A1 (<http://ep.espacenet.com>).
2. MIPAF, 2006. Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali 7 aprile 2006 “Criteri e norme tecniche per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento.
3. Fontana F., Caroli M., 2006. “Economia e gestione delle imprese”, seconda edizione, McGraw-Hill.
4. Golfari et al., 2010. “Tecnologia biologica per il trattamento di pollina di ovaiole: Progetto MIDA di sanitarizzazione” SIPA 2010.
5. Nonni S., 2009. “Introduzione sul mercato di un nuovo fertilizzante organico di qualità” Tesi di laurea. Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Gestionale. A.A. 2008/2009. Università di Bologna.

Ringraziamenti

Si ringraziano le aziende AMEK (Ferrara) e Coop. Trasporti Imola (CTI, Imola, BO) per avere contribuito alla sperimentazione con l'utilizzo della loro tecnologia e il gruppo EUROVO per aver permesso e contribuito alla sperimentazione nei suoi allevamenti.

Figura 1. Processo produttivo per la Tettoia A.



- Riemp: formazione del cumulo all'interno della tettoia (durata totale: 45gg.)
- Maturazione del cumulo all'interno della tettoia (durata totale: 120gg.)
- Tolgo: il cumulo, finito il periodo di maturazione, è un fertilizzante e viene caricato su camion e portato all'agricoltore.
- Periodi "morti" del processo in cui, anche se il cumulo precedente è già stato portato via, il nuovo cumulo per problemi logistici non può essere formato

Figura 2. Processo produttivo Tettoia A nel caso di produzione sia di pollina sfusa che di *big bag*.



- Riemp: formazione del cumulo all'interno della tettoia (durata totale: 45gg.)
- Maturazione del cumulo all'interno della tettoia (durata totale: 120gg.)
- Tolgo: il cumulo, finito il periodo di maturazione, è un fertilizzante e viene caricato su camion e portato all'agricoltore.
- Dieta: periodi di malfunzionamento dell'impianto o di alimentazione particolare delle galline in cui viene prodotta pollina molto umida e perciò non utilizzabile per la produzione del fertilizzante.
- Big-bag: periodo di produzione dei big-bags
- Periodi "morti" del processo in cui, anche se il cumulo precedente è già stato portato via, il nuovo cumulo per problemi logistici non può essere formato

Tabella 1. Prospetto degli investimenti.

Impianti ed interventi previsti	Investimento richiesto (€)	Durata ammortamento (anni)	Quota ammortamento annua (costante) ¹ (€/anno)
Apertura posteriore	409	/	/
Sistema pareti mobili e porta posteriore	25.277	5 anni	5055,4
Zanzariere	2.375	/	/
Totale	28.061		

Tabella 2. Costi operativi.

Costi operativi	B2C €/anno	B2B €/anno
Manodopera	15.000	15.000
Consumi energetici e manutenzione	300	300
Trasporto (B2C)	6.642	
Trasporto (B2B) (costo eliminato con l'attuazione del progetto)		-11.808
PAV	11070	11070

Tabella 3. Costi generali dovuti alla produzione della pollina PAV.

Costi generali	Importo
Iscrizione ai registri	1.000 € (solo primo anno)
Analisi	1.000 €/anno
Gestione amministrativa e commerciale (B2C)	18.000 €/anno
Gestione amministrativa (B2B)	10.000 €/anno
Promozione	2.500 € il primo anno 700 € gli anni successivi
Creazione e registrazione marchio	1.500 € il primo anno 80 € gli anni successivi

Tabella 4. Ricavi annuali ottenuti.

Ricavi derivanti dalla vendita della pollina PAV	Importo (€)
B2C	125.460
B2B	88.560

Tabella 5. Ipotesi di base per il calcolo del VAN.

Durata del progetto	5 anni
Volumi di produzione previsti	1845 t/anno
Volumi commercializzati previsti	1476 t/anno
Periodo di produzione della pollina PAV	3 giorni di MDS + 45 giorni di formazione del cumulo + 120 giorni di maturazione
Tempi di processo	Realizzazione di 6 cumuli nel primo anno e di tre nel secondo; commercializzazione del prodotto nei periodi Lug.-Ago.-Set. e Feb-Mar-Apr.
Percentuale di PAV a regime	0,3 kg di PAV per 1 t di pollina nel cumulo
Stoccaggio e trasporto prodotto finito	Stoccaggio in allevamento e servizio di trasporto fornito dall'allevamento nel caso B2C
Acquisto e trasporto PAV	Pagato come servizio ad Amek
Tipologia e copertura per lo stoccaggio	Tettoia, dove possono essere realizzati 3 cumuli di pollina
Quantità di deiezioni per PUA	886 t di pollina
Tasso di attualizzazione	0,05
Formato di vendita	Prodotto sfuso

¹ Il primo anno la contabilità aziendale impone che la quota di ammortamento di immobili ed impianti sia fissata al 50% della quota di ammortamento annua teoricamente prevista in base al piano di ammortamento scelto. Per questo motivo il primo anno si avranno 2.527,7 € per il sistema di pareti mobili.

Tabella 6. VAN nel caso B2C.

		TAB. 14.13 :ANALISI INVESTIMENTO B2C - METODO VAN - STEP 1					
		anni					
		0	1	2	3	4	5
RICAVI (A)		0	125.460	125460	125460	125460	125460
Costo del venduto (B)		0	33012	33012	33012	33012	33012
C1	Iscrizione al Registro dei fertilizzanti e dei Fabbricanti di fertilizzanti	1000					
C2	Costi generali (analisi)		1000	1000	1000	1000	1000
C3	Costi generali(amministrativi e commerciali)		18000	18000	18000	18000	18000
C4	Costi promozionali		2500	700	700	700	700
C5	Costi marchio	1500	80	80	80	80	80
	Altri costi operativi (C.)	2500	21580	19780	19780	19780	19780
REDDITO OPERATIVO (D=A-B-C)		-2500,00	70.868	72668	72668	72668	72668
	Ammortamento	0	2527,7	5055,4	5055,4	5055,4	5055,4
REDDITO ANTE IMPOSTE		-2500,00	68.340	67612,6	67612,6	67612,6	67612,6
	Aliquota imposte	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Imposte (E)	-1250	34170,15	33806,3	33806,3	33806,3	33806,3
REDDITO NETTO (F=D-E)		-1250,00	34.170,15	33806,3	33806,3	33806,3	33806,3
	Variaz. Capitale Circolante Netto (G)	0	0	0	0	0	0
	Ammortamento (H)		2527,7	5055,4	5055,4	5055,4	5055,4
	Investimento (I)	28061					
FLUSSO DI CASSA NETTO (F-G+H-I)		-29311,00	36.697,85	38861,7	38861,7	38861,7	38861,7
	Tasso di attualizzazione (WACC)		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	Fattore di sconto		0,9524	0,907	0,8638	0,8227	0,7835
FdC attualizzato		-29311,00	34951,0323	35247,5619	33568,7365	31971,5206	30448,142
VALORE ATTUALE NETTO (VAN)			€136.875,99				

Tabella 7. VAN nel caso B2B.

		TAB. 14.14 :ANALISI INVESTIMENTO B2B - METODO VAN - STEP 1					
		anni					
		0	1	2	3	4	5
RICAVI (A)		0	88.560	88.560	88.560	88.560	88.560
Costo del venduto (B)		0	14562	14562	14562	14562	14562
C1	Iscrizione al Registro dei fertilizzanti e dei Fabbricanti di fertilizzanti	1000					
C2	Costi generali (analisi)		1000	1000	1000	1000	1000
C3	Costi generali(amministrativi e commerciali)		10000	10000	10000	10000	10000
C4	Costi promozionali		2500	700	700	700	700
C5	Costi marchio	1500	80	80	80	80	80
	Altri costi operativi (C.)	2500	13580	11780	11780	11780	11780
REDDITO OPERATIVO (D=A-B-C)		-2500,00	60.418	62218	62218	62218	62218
	Ammortamento	0	2527,7	5055,4	5055,4	5055,4	5055,4
REDDITO ANTE IMPOSTE		-2500,00	57.890	57162,6	57162,6	57162,6	57162,6
	Aliquota imposte	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Imposte (E)	-1250	28945,15	28581,3	28581,3	28581,3	28581,3
REDDITO NETTO (F=D-E)		-1250,00	28.945,15	28581,3	28581,3	28581,3	28581,3
	Variaz. Capitale Circolante Netto (G)	0	0	0	0	0	0
	Ammortamento (H)		2527,7	5055,4	5055,4	5055,4	5055,4
	Investimento (I)	28061					
FLUSSO DI CASSA NETTO (F-G+H-I)		-29311,00	31.472,85	33636,7	33636,7	33636,7	33636,7
	Tasso di attualizzazione (WACC)		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	Fattore di sconto		0,9524	0,907	0,8638	0,8227	0,7835
FdC attualizzato		-29311,00	29974,7423	30508,4869	29055,3815	27672,9131	26354,3545
VALORE ATTUALE NETTO (VAN)			€114.254,88				

Tabella 8. Ipotesi iniziali del VAN nello step II.

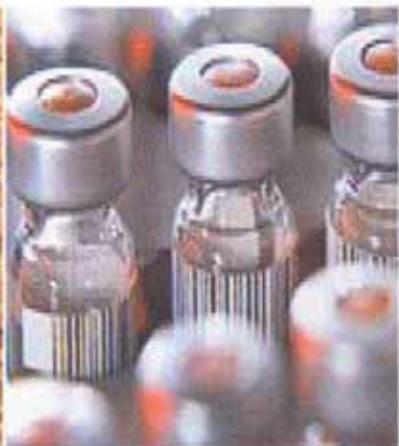
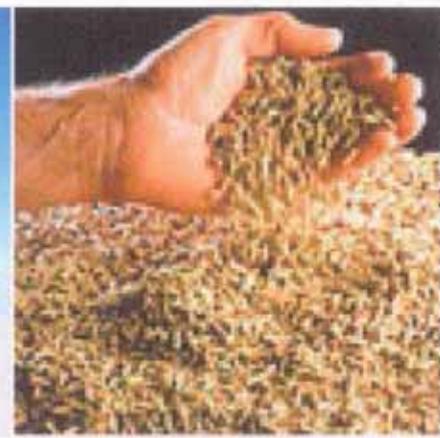
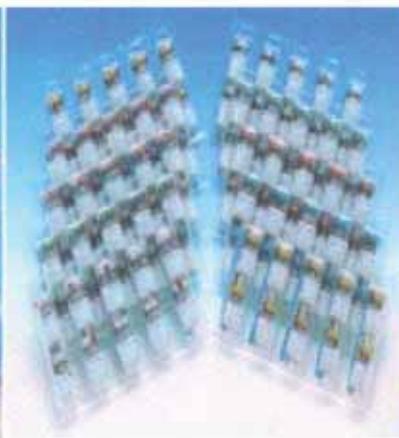
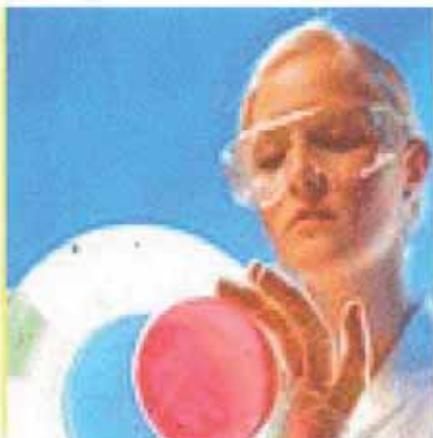
Durata del progetto	7 anni
Volumi di produzione previsti	1470 big-bag/anno da 600 kg l'uno
Volumi commercializzati previsti	1470 big-bag/anno da 500 kg l'uno
Periodo di produzione della pollina PAV	3 giorni di MDS + 120 giorni di maturazione all'interno del big-bag
Tempi di processo	Realizzazione di 15 big-bag al giorno in un tempo di circa 2 ore e mezzo.
Percentuale di PAV a regime	0,8 kg di PAV per 1 big-bag
Stoccaggio e trasporto prodotto finito	Stoccaggio in magazzino e servizio di trasporto fornito dall'allevamento nel caso B2C
Acquisto e trasporto PAV	Pagato come servizio ad Amek
Tipologia e copertura per lo stoccaggio	Realizzazione di un magazzino con scaffalature porta pallet
Tasso di attualizzazione	0,05
Formato di vendita	Prodotto in big-bag

Tabella 9. Prospetto del VAN nel caso B2C.

		TAB. 14.20 :ANALISI INVESTIMENTO B2C - METODO VAN- STEP 2									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	
RICAVI (A)		0	80.850	80.850	80.850	80.850	80.850	80.850	80.850	80.850	
Costo del venduto (B)		0	49639	49639	49639	49639	49639	49639	49639	49639	
C2	Costi generali (analisi)	0	500	500	500	500	500	500	500	500	
C3	Costi generali (amministrativi e commerciali)	0	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	
C4	Costi promozionali	0	1800	0	0	0	0	0	0	0	
	Altri costi operativi (C)	0	6300	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	
REDDITO OPERATIVO (D=A-B-C)		0,00	24.911	26711	26711	26711	26711	26.711	26.711	26.711	
	Ammortamento	0	6785,72	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	6785,72	
REDDITO ANTE IMPOSTE		0,00	18.125	13139,57	13139,57	13139,57	13139,57	13.140	13.140	19.925	
	Aliquota imposte	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
	Imposte (E)	0	9062,64	6569,785	6569,785	6569,785	6569,785	6569,785	6569,785	9962,64	
REDDITO NETTO (F=D-E)		0,00	9.062,64	6569,785	6569,785	6569,785	6569,785	6.569,8	6.569,8	9.962,6	
	Variaz. Capitale Circolante Netto (G)		0	0	0	0	0				
	Ammortamento (H)		6785,72	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	6785,72	
	Investimento (I)		101353,3								
FLUSSO DI CASSA NETTO (F+G+H-I)		-101353,30	15.848,36	20141,215	20141,215	20141,215	20141,215	20.141,2	20141,215	16.748,4	
	Tasso di attualizzazione (WACC)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
	Fattore di sconto	0,907	0,8638	0,8227	0,7835	0,7462	0,7107	0,6768	0,6446	0,6139	
FdC attualizzato		-91927,44	13689,8134	16570,1776	15780,642	15029,3746	14314,3615	13631,5743	12983,0272	10281,8182	
VALORE ATTUALE NETTO (VAN)		€20.353,35									

Tabella 10. Prospetto del VAN nel caso B2B.

TAB. 14.21 :ANALISI INVESTIMENTO B2C - METODO VAN- STEP 2									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RICAVI (A)	0	59.535	59.535	59.535	59.535	59.535	59.535	59.535	59.535
Costo del venduto (B)	0	37879	37879	37879	37879	37879	37879	37879	37879
C2 Costi generali (analisi)	0	500	500	500	500	500	500	500	500
C3 Costi generali (amministrativi e commerciali)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C4 Costi promozionali	0	1800	0	0	0	0	0	0	0
Altri costi operativi (C)	0	2300	500	500	500	500	500	500	500
REDDITO OPERATIVO (D=A-B-C)	0,00	19.356	21156	21156	21156	21156	21.156	21.156	21.156
Ammortamento	0	6785,72	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	6785,72
REDDITO ANTE IMPOSTE	0,00	12.570	7584,57	7584,57	7584,57	7584,57	7.585	7.585	14.370
Aliquota imposte	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Imposte (E)	0	6285,14	3792,285	3792,285	3792,285	3792,285	3792,285	3792,285	7185,14
REDDITO NETTO (F=D-E)	0,00	6.285,14	3792,285	3792,285	3792,285	3792,285	3.792,3	3.792,3	7.185,1
Variaz. Capitale Circolante Netto (G)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ammortamento (H)		6785,72	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	13571,43	6785,72
Investimento (I)		101353,3							
FLUSSO DI CASSA NETTO (F-G+H-I)	-101353,30	13.070,86	17363,715	17363,715	17363,715	17363,715	17.363,7	17363,715	13.970,8
Tasso di attualizzazione (WACC)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Fattore di sconto	0,907	0,8638	0,8227	0,7835	0,7462	0,7107	0,6768	0,6446	0,6139
FdC attualizzato	-91927,44	11290,6089	14285,1283	13604,4707	12956,8041	12340,3923	11751,7623	11192,6507	8576,71095
VALORE ATTUALE NETTO (VAN)		€4.071,09							



• Vaccines

• Feed additives

Partner impegnati

La nostra competenza globale garantisce l'assistenza sul posto.

L'industria della produzione animale a livello mondiale si affida ai nostri additivi zootecnici ed ai nostri vaccini avicoli di alta qualità. La loro efficacia nella prevenzione delle patologie sono segno del nostro successo.

 **Lohmann**
Animal Health

Prevention first.

Lohmann Animal Health
Via G. Cadorna 8/133
20090 Buccinasco (MI), Italy
Phone: +39 02 45 71 24 47
Fax: +39 02 45 70 46 83
www.lohmann.de

ATOXOPLASMOSI NELL'ALLEVAMENTO DEL CARDELLINO (*CARDUELIS CARDUELIS*)

Borrelli L., Dipineto L., Mirabile M., Pisano S., Gargiulo A., De Luca Bossa L., Russo T., Calabria M., Sensale M., Santaniello A., Rinaldi L., Cringoli G., Menna L.F., Fioretti A.

Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli Federico II

Introduzione

Isospora spp. è un protozoo endocellulare obbligato i cui oocisti sono caratterizzate dal possedere due sporocisti contenenti quattro sporozoit. All'interno del genere *Isospora* spp. esistono due importanti specie, *Atoxoplasma serini* (*Isospora serini*) ed *Isospora canaria*, segnalate in varie specie di passeriformi. Spesso questi due protozoi parassitano contemporaneamente lo stesso individuo ospite sebbene presentino un differente ciclo vitale. Infatti, *Isospora canaria* possiede un ciclo vitale esclusivamente di tipo intestinale mentre la peculiarità di *Atoxoplasma serini* è quella di possedere un ciclo vitale di tipo extraintestinale. Questo ultimo parassita è stato segnalato da diversi Autori come agente responsabile di una grave forma di malattia, spesso ad esito fatale, in canarini, fringillidi e passeri domestici.

Alla luce di quanto esposto, lo scopo della presente indagine è stato quello di valutare la presenza di *Atoxoplasma serini* in cardellini di allevamento (*Carduelis carduelis*) e, considerando anche le frequenti cross-infezioni con *Isospora canaria*, di fornire un supporto diagnostico basato sulle differenze eziopatogenetiche tra le due specie di parassiti e le conseguenti scelte terapeutiche.

Materiali e metodi

Da Settembre 2009 a Marzo 2010 sono stati monitorati 5 allevamenti di cardellini ubicati nella Regione Campania. La popolazione oggetto di indagine ammontava a circa 50 esemplari. Al fine di non falsare i risultati, i volatili esaminati non hanno ricevuto trattamenti con farmaci ad azione coccidiostatica durante il periodo di campionamento. In ciascun allevamento si effettuavano, durante il periodo di indagine, 3 visite. Per ogni visita venivano raccolti dai sottogabbia 4 pool di feci per un totale di 60 pool (12 pool/allevamento). Per ogni pool veniva effettuata una flottazione iniziale per valutarne la positività. I campioni positivi venivano immersi in bicromato di K^{++} al 2,5% dove vi rimanevano per una settimana a temperatura ambiente, affinché si completasse il processo di sporulazione tramite la continua ossigenazione. I campioni, quindi, venivano sottoposti a flottazione previa centrifugazione per eliminare il bicromato di K^{++} in eccesso ed osservati al microscopio ottico micrometrico.

Risultati

I risultati della presente indagine hanno evidenziato la presenza di *Atoxoplasma serini* in tutti gli allevamenti analizzati. Non tutti i soggetti positivi ad *Atoxoplasma serini* presentavano una sintomatologia clinica evidente o specifica.

Discussione

La nostra indagine, rispetto ai dati bibliografici esistenti, ha constatato che l'infezione da *Atoxoplasma serini* rappresenta una frequente parassitosi a carico degli allevamenti di cardellini. Sebbene la maggior parte dei loro ospiti sia in grado, col tempo, di opporre un'efficace resistenza immunitaria, l'infezione primaria, in particolare nei soggetti giovani, può spesso rivelarsi fatale, così quando concorrono le fasi di maggiore stress fisiologico dei volatili come la cova, svezzamento e la muta. La problematica principale è legata alla possibilità che gli stadi dormienti del parassita possano nuovamente invadere le cellule dell'ospite a prescindere dal trattamento terapeutico. I c.d. "merozoitidi d'attesa" extraintestinali, infatti, possono rappresentare un reservoir per la ricolonizzazione intestinale al momento della sospensione terapeutica ed anche in seguito ad un abbassamento delle difese immunitarie. Ciò chiarisce il motivo per il quale i trattamenti farmacologici, malgrado implicino una remissione sintomatologica, come riportato in letteratura, non abbiano mai permesso la completa sterilizzazione dell'ospite dal parassita. La presente indagine evidenzia un'alta prevalenza di *A. serini* in soggetti che presentavano o meno sintomatologia clinica. Sarebbe auspicabile, pertanto, al fine di controllare questa parassitosi, effettuare monitoraggi routinari e trattamenti terapeutici mirati mediante l'utilizzo di prodotti che stabilizzino l'attività immunitaria dell'ospite, evitando, così, anche l'utilizzo costante dei farmaci che vengono comunemente impiegati. Il tutto è attuabile in concomitanza di buone norme di biosicurezza legate ad un miglioramento delle condizioni igieniche e, soprattutto, di benessere animale.

Bibliografia

1. **Box E.**, 1970 : *Atoxoplasma* associated with an isosporan oocyst in canaries. *J. Protozool.* 17:391-396
2. **Box E.**, 1975 : Exogenous stages of *Isospora serini* and canaria in the canary. *J. Protozool.* 11:165-169
3. **Box E.**, 1981 : *Isospora* as an extraintestinal parasite of passerine birds. *J. Protozool.* 28:244-246
4. **Cringoli G., Quesada A.**, 1990: Indagini preliminari sull'attività dell'associazione sulfachinossalina, sulfadimetossina e diaveridina nei confronti di *Isospora* spp nel fanello (*Carduelis cannabina*) *Riv. Di Parassitol.*, 3:301-308
5. **Cringoli G.** et al., 1994 : I coccidi nei volatili selvatici: sulla biologia di alcuni generi. Atti XIII Convegno Nazionale Patologia della selvaggina, Volterra 17-19 Marzo.
6. **Gabrisch K., Zwart P.** , 2001 : Atoxoplasmosi. In *Medicina e chirurgia dei nuovi animali da compagnia* Vol. I: 33 ed. UTET, Torino.
7. **Gill H., Paperna I.**, 2008 : Proliferative visceral *Isospora* (atoxoplasmosis) with morbid impact on the Israeli sparrow (*Passer domesticus biblicus*) *Hartert* 1904. *Parasitol Res* 103:493-499.
8. **Levine N.D.**, 1982: Taxonomy and life cycle of coccidia in *The biology of the coccidian*, edit by Peter Long, Edward Arnold, Athene, Georgia.
9. **Sánchez-Cordón P. J.**, 2005: *Atoxoplasma* spp. Infection in Captive Canaries (*Serinus canaria*). *Vet. Med. A* 54, 23-26

DIFFERENZIAZIONE DI DUE CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* DA CAMPIONI DI TRACHEA E OVIDUTTO PROVENIENTI DA UN ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE

Catania S.¹, Ramirez A.S.², Gobbo F.¹, Brustolin M.¹, Dare C.M.³, Bradbury J.M.³

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy

² Unit of Epidemiology and Preventive Medicine, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

³ University of Liverpool, School of Veterinary Science, Neston, UK

Abstract

Recently some Authors have reported characteristic lesions in the apex of eggs (classified as EAA, *Eggshell Apex Abnormalities*) associated to *Mycoplasma sinoviae* (MS) infection in hen layers (1). In this study we reported a clinical case of EAA in three flock of a farm in North-East Italy. Some animals, selected from positive flocks, were collected and submitted to several analyses: gross pathology and histopathology of oviduct. Therefore tracheal and oviductal swabs were submitted to PCR and culture isolation for MS.

The elaboration of results let us to point out a positive correlation between EAA and MS strains isolated from the oviducts.

Sequencing of the gene *vlhA* of some isolates from trachea and oviduct demonstrated a deletion of 39 nucleotide in the region that includes the tandem repeats that encode proline-rich repeats (PRR) and a difference of three nucleotides in the highly polymorphic region RIII. Taking together these evidence we demonstrated that two different strain of MS can exist, with different tissue-tropism.

Introduzione

Mentre il ruolo di *Mycoplasma synoviae* (MS) è stato ampiamente documentato nell'allevamento avicolo da carne, poche informazioni sono disponibili riguardo diffusione, patologia ed impatto economico nell'allevamento della gallina ovaiole.

Recentemente caratteristiche lesioni dell'apice del guscio, note come *Eggshell Apex Abnormalities* (EAA) (1), sono state correlate all'infezione da MS; tali alterazioni determinano aumentata fragilità causando importanti perdite economiche (2).

Rimane ancora da capire come a fronte di una elevata prevalenza di infezione per MS nel comparto delle ovaiole i casi riferibili ad EAA non siano così frequenti. Sulla base di tale affermazione e sulle discrepanze cliniche da noi evidenziate in un allevamento di galline ovaiole ci siamo proposti di analizzare mediante biologia molecolare i ceppi di MS isolati da differenti matrici al fine di evidenziare eventuali differenze.

Materiali e Metodi

Da alcuni soggetti provenienti dai differenti capannoni dell'allevamento sono state effettuate indagini di laboratorio, quali l'esame anatomo-patologico ed istologico da ovidutto. Inoltre dagli stessi animali sono stati prelevati tamponi tracheali e oviduttali e sottoposti ad esame colturale (*modified Frey medium*) e biomolecolare (PCR) per la ricerca di MS.

Alcuni dei ceppi di MS isolati da trachea ed ovidutto sono stati analizzati anche mediante PCR per il gene *vlhA*, l'amplificato ottenuto è stato sequenziato al fine di evidenziare eventuali differenze (3).

Risultati e discussione

Il gruppo stabulato nel capannone 1, negativo per MS all'introduzione in allevamento, è risultato essere positivo (Isolamento colturale e PCR) dopo diverse settimane solamente da tamponi tracheali ma non oviduttali. In questo gruppo di animali non sono state rilevate uova con lesioni riferibili a EAA.

Al contrario, nei capannoni 2 e 3, dove l'incidenza di EAA era variabile, MS è stato isolato sia da tamponi tracheali che oviduttali, inoltre l'incidenza di uova lesionate sembrava positivamente correlata alla presenza di MS da ovidotto.

Al fine di evidenziare la presenza di un ceppo di MS con tropismo specifico per l'ovidutto abbiamo deciso di sottoporre ad analisi biomolecolare alcuni dei ceppi da noi isolati, cercando di analizzare ceppi provenienti dal capannone 1 in cui non sono state rilevate lesioni riferibili ad EAA e dal capannone 3 in cui l'incidenza di uova con lesioni era alta. In particolare sono stati scelti un ceppo di MS isolato da trachea ed appartenente al capannone 1, un ceppo di MS isolato da trachea appartenente al capannone 3 ed un ceppo di MS isolato da ovidutto anch'esso appartenente al capannone 3. La comparazione delle sequenze del gene *vlhA* ha consentito di identificare differenze geniche situate in una regione con *tandem repeats* che codificano per le PRR (*proline-rich repeats*).

In particolare in tale regione il ceppo isolato da ovidutto presenta una delezione di 39 nucleotidi e una sostituzione di 3 nucleotidi a carico della regione altamente polimorfica RIII. I due ceppi isolati da trachea, pur provenienti da differenti capannoni, non hanno mostrato differenze a carico di tale regione. Quindi sulla base di ciò si può affermare che i ceppi isolati da trachea sono identici tra loro mentre il ceppo isolato da ovidutto risulta essere differente a conferma della nostra ipotesi.

Le inserzioni/delezioni nella regione PRR potrebbero essere correlate alla diversa patogenicità dei ceppi; ulteriori analisi biomolecolari sono in corso per supportare od escludere tali evidenze.

In conclusione un nuovo ceppo di *Mycoplasma synoviae* è stato dimostrato. Tale ceppo, distinguibile dal ceppo tracheale, sembrerebbe presentare uno spiccato tropismo per il tessuto oviduttale, e potrebbe essere l'agente eziologico di EAA. Tale affermazione viene inoltre supportata dalla correlazione positiva tra incidenza di EAA e prevalenza di MS in ovidotto e dall'assenza di lesioni riferibili a EAA nel capannone 1, positivo per MS unicamente da trachea.

Bibliografia

1. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 2009 Feb;38(1):77-85.
2. Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Iob L. and Nicholas R. A. J.. Treatment of egg-shell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Diseases: Article In Press.*
3. Hammond PP, Ramírez AS, Morrow CJ, Bradbury JM. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet Microbiol.* 2009 Apr 14;136(1-2):61-8. Epub 2008 Nov 1.

INDAGINE PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN ALLEVAMENTI AVICOLI ITALIANI

¹ Catania S., ² Ceruti R., ³ Mingardo M., ⁴ Ortali G., ¹ Terregino C., ¹ Iob L.

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, (PD), Italy, scatania@izsvenezie.it

² Gesco Con. Coop., Via Bonfadina 9, Cazzago San Martino (BS) Italy

³ P.A.I.: SRL, via Giovanni XXIII Monte di Malo (VI) Italy

⁴ Gruppo Veronesi, Quinto di Valpantena (VR) Italy

Abstract

Mycoplasma species are important pathogens for poultry industry and particularly *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) can cause severe economic losses. In this preliminary report we try to trace the presence of MG and MS in the different poultry population reared intensively in Italy. The MS prevalence was higher in meat type turkey flocks, and broiler breeders. MG infection appears to be sporadically present in turkey, also because the major part of poultry integrated companies have adopted a voluntary eradication policy. These data should make a preliminary study to emphasize the importance of the epidemiological studies to understand the pattern of mycoplasma spreading in different sectors of the poultry industry.

Introduzione

I micoplasmi sono microorganismi unicellulari privi di parete cellulare capaci di infettare animali, uomo, insetti e piante: tale caratteristica strutturale conferisce loro resistenza ai comuni chemioterapici che agiscono sulla parete cellulare. Le specie di micoplasmi ad oggi identificate sono più di 100 e in ambito aviario sono oltre 25 le specie attualmente conosciute. All'interno di queste specie quelle che rivestono un particolare interesse per l'industria avicola sono rappresentate dal *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma iowae*. Tale interesse è strettamente correlato agli effetti negativi sulle differenti tipologie di produzioni avicole. Allo stato attuale, nel territorio Italiano, non sono presenti segnalazioni riguardanti episodi ascrivibili al *M. meleagridis* e *M. iowae*, mentre sono numerose le segnalazioni riguardanti MG e MS. Il *Mycoplasma gallisepticum* è stato riscontrato in numerose specie aviarie in cui causa principalmente problemi di tipo respiratorio con interessamento delle prime vie respiratorie e dei sacchi aerei, provocando gravi aerosacculiti con tosse e rantoli e conseguente crescita stentata. Inoltre, in soggetti in ovodeposizione, può determinare un calo della produzione di uova. Il contenimento di tale patogeno si basa su rigorose misure di biosicurezza e sul mantenimento di gruppi di riproduttori micoplasma free.

Il *Mycoplasma synoviae* è spesso coinvolto in forme respiratorie e articolari che interessano in maggior misura gli animali all'ingrasso. Recentemente è stato correlato a specifiche alterazioni del polo apicale del guscio in galline ovaiole. La trasmissione per via verticale è stata ampiamente dimostrata ed il contenimento dell'infezione si basa come per MG sulla produzione e mantenimento di gruppi MS free. Purtroppo

le misure attualmente applicate non sembrerebbero altamente efficaci, difatti negli ultimi anni si è assistito ad una presenza importante di tale patogeno in tutti i settori produttivi dell'industria avicola.

Al fine di mantenere elevata l'attenzione degli addetti al settore avicolo e di individuare eventuali punti deboli del sistema di controllo si è voluto valutare la presenza nei vari settori produttivi di MG e MS in diverse aree del territorio italiano.

Materiali e Metodi

I colleghi operanti nel settore avicolo sono stati contattati al fine di condividere i dati provenienti dai controlli interni di filiera. Al fine di rendere omogenei i dati, date le differenti tipologie di metodiche utilizzate, e per consentire una corretta identificazione della positività del gruppo si è deciso di valutare ai fini del presente report come infetti solamente i gruppi che:

- presentavano due positività in PCR consecutive a distanza di almeno due settimane;
- sieropositività in ELISA successive alle positività mediante metodica biomolecolare;
- isolamento diretto del patogeno da tamponi tracheali o da organi.

I dati sull'infezione, forniti dagli operatori di filiera, sono stati raccolti congiuntamente alla metodica diagnostica utilizzata, alla specie, all'indirizzo produttivo, all'età di positivizzazione del gruppo, al comune in cui era ubicato l'allevamento, ed a eventuali sintomi correlabili al patogeno.

Saranno di seguito valutati e commentati prevalentemente i dati riguardanti gli allevamenti di riproduttori di pollo e di tacchino e gli allevamenti da ingrasso di tacchino. Tale decisione deriva dal fatto che per il broiler non sono applicati sistemi di monitoraggio routinari. Per quanto riguarda le galline ovaiole purtroppo i dati a nostra disposizione non possono essere considerati rappresentativi della realtà poiché i piani di controllo/monitoraggio tra le varie filiere sono notevolmente differenti, così come differente risulta essere la strutturazione di questo settore produttivo

Risultati e discussione

I risultati di questa indagine conoscitiva hanno dimostrato l'infezione durante l'anno 2009 per MG in un solo gruppo di polli riproduttori con sintomatologia respiratoria, mentre MS è stato individuato in ben 24 gruppi di riproduttori che non hanno manifestato sintomatologia ascrivibile al patogeno. Per il tacchino riproduttore sono stati dimostrati 2 gruppi positivi per MG con evidente sintomatologia respiratoria e 4 positivi per MS di cui tre con sintomatologia respiratoria. Nel tacchino da carne si è rilevata la positività per MG in 23 gruppi di cui 7 nella provincia di Verona contro 27 gruppi positivi per MS di cui 14 localizzati nella provincia di Verona (Grafico 1). In tale categoria produttiva solamente un gruppo infetto da MG non ha palesato sintomatologia evidente, mentre i rimanenti 22 gruppi hanno manifestato una forma prettamente respiratoria. Nel caso di MS 20 gruppi hanno manifestato interessamento articolare e respiratorio, mentre i rimanenti 7 hanno palesato forme cliniche piuttosto blande, e aggravate per lo più da sovrapposizioni batteriche. Solamente un gruppo ha manifestato la coesistenza di MG e MS, con una severa sintomatologia di tipo respiratorio e classiche sinusiti infraorbitali.

Purtroppo la scarsa omogeneità nel rilievo dei dati riguardanti le galline ovaiole

non permette il loro approfondimento, anche se sembrerebbe essere il comparto con il maggior numero di gruppi positivi. I pochi dati raccolti dimostrano infatti la presenza di 4 gruppi positivi per MG e 12 gruppi positivi per MS. Solamente in tre gruppi infetti da MS si è notata l'alterazione del polo apicale del guscio e una diminuzione del peso delle uova deposte. Nei rimanenti gruppi infetti non sono state riportate manifestazioni cliniche ascrivibili a micoplasmi.

I dati relativi ai riproduttori di pollo evidenziano una costante presenza dell'infezione durante tutto l'anno, dato non riscontrato nel tacchino riproduttore.

Relativamente ai tacchini da carne si può notare (Grafico 2) come la presenza di MS sembrerebbe mantenersi costante per tutto l'anno con un picco di infezione specificatamente intorno al periodo primaverile. In tale settore va tenuta in debito conto la maggiore durata del suo ciclo produttivo (sovrapponibile a due cicli di broiler) e quindi maggiori esposizioni al rischio di infezione. Per quanto riguarda MG la sua presenza è saltuaria con improvvisi picchi nei mesi di agosto e dicembre-gennaio ed in questo senso vanno valutate le interazioni tra animale ed ambiente tra cui condizioni climatiche difficili. Da non trascurare, infine l'introduzione di animali di un giorno o di uova da cova dall'estero, spesso in assenza di informazioni sanitarie riguardanti i gruppi riproduttori di origine. Ulteriori indagini dovranno confermare questi dati relativi alla stagionalità delle infezioni da MS e MG.

Conclusioni

I diversi livelli di biosicurezza applicati nei gruppi di riproduttori rispetto a quelli applicati negli allevamenti da carne potrebbero eliminare o almeno contenere la possibilità di infezioni, correlabili a diffusione dei micoplasmi da gruppi positivi localizzati nelle vicinanze. Da questi dati preliminari emerge che la localizzazione di gruppi di riproduttori pesanti è distribuita su di una vasta area geografica comprendente sia regioni settentrionali che regioni centromeridionali. Ciò porta ad ipotizzare che più fonti di infezione siano da considerare per questo settore.

Nel tacchino da carne, nonostante la presenza costante di MS durante l'intero anno, sono state rilevate in aree ad alta densità di popolazioni oscillazioni con un netto incremento nel periodo primaverile. Tali picchi sono potenzialmente ascrivibili alla positivizzazione di gruppi contigui e quindi a nostro parere esiste la necessità di approfondire i legami funzionali che possano giustificare tale diffusione. Come già detto la diffusione di Mg ha andamenti sporadici interessando contemporaneamente più aziende contigue.

La carenza di dati riguardanti il settore della gallina ovaiole, del broiler e di altri settori considerati minori (faraona, capponi, galletti e selvaggina da penna), ma potenziali serbatoi dell'infezione, non permette di avere un quadro realistico della diffusione di MS e di MG nell'intero settore avicolo italiano. In conclusione una raccolta di dati omogenea strutturata sulla base di analisi statistiche, con l'ausilio di dati GIS, e con l'applicazione di tecniche biomolecolari per la caratterizzazione dei ceppi circolanti, potrà permettere la valutazione e contestualizzazione all'interno del singolo distretto produttivo della reale prevalenza del problema, indicando eventuali e potenziali opzioni di controllo.

Grafico 1. Distribuzione geografica dei gruppi di tacchini da carne positivi per MG ed MS.

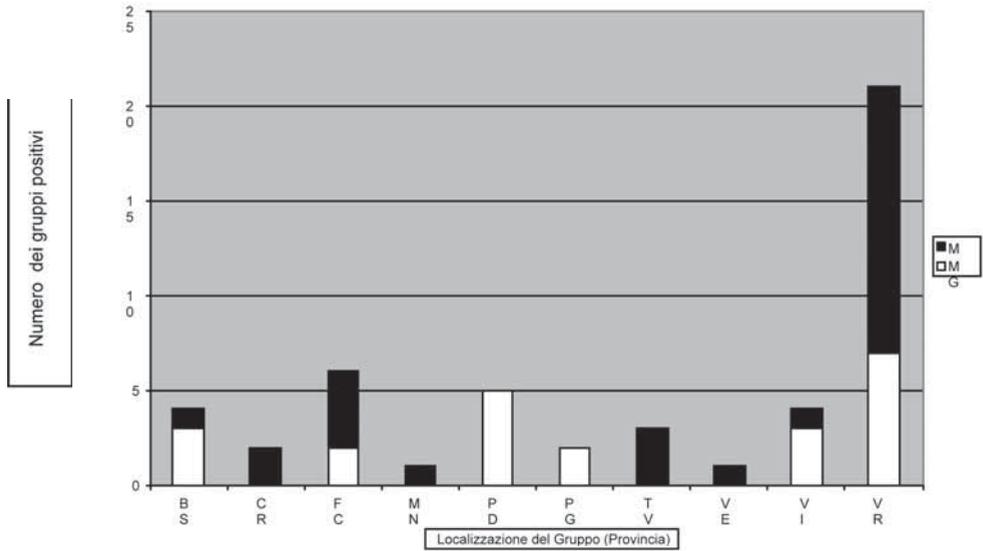
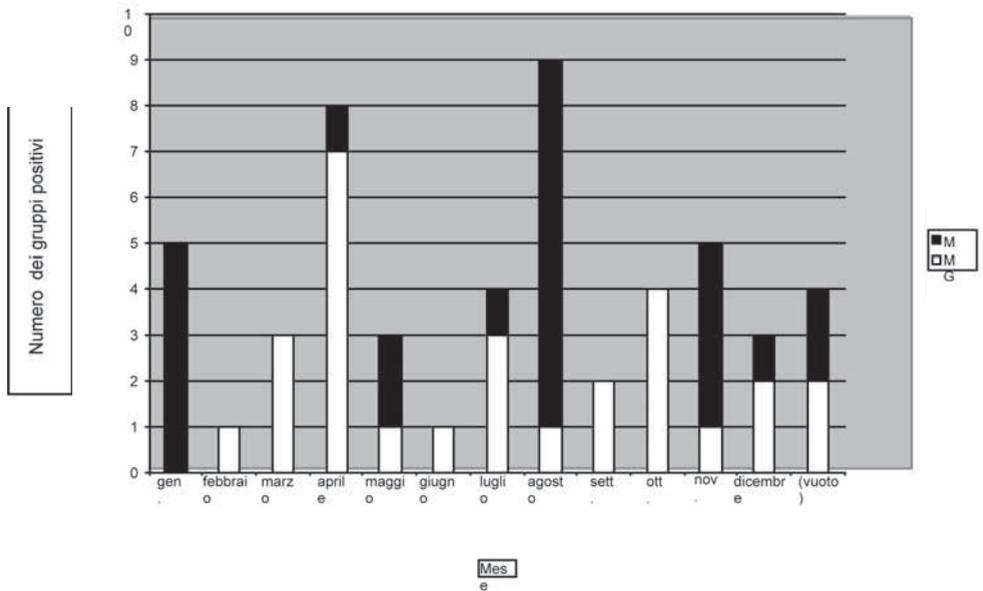


Grafico 2. Distribuzione temporale dei gruppi di tacchini da carne positivi per MG ed MS.



ISOLAMENTO DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN UN ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE IN RELAZIONE AD ALTERAZIONI APICALI DEL GUSCIO (*EGGSHELL APEX ABNORMALITIES*)

Catania S.¹, Gobbo F.¹, Quattieri K.¹, Bilato D.¹, Iob L.¹, Nicholas R. A. J.²

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, (PD), Italy, scatania@izsvenezie.it*

²*Veterinary Laboratory Agency (Weybridge), New Haw, Addlestone Surrey. United Kingdom*

Abstract

Mycoplasma synoviae is considered an important pathogen affecting poultry and it is responsible of respiratory and articular disease, which can cause severe economic losses in industrial production. Recently Authors reported a new and unusual lesion in the apex of eggshell associated with *Mycoplasma synoviae* infection called *Eggshell Apex Abnormalities* (EAA). EAA were seen in two flocks of multi-age Hy-Line hen layer housed in a farm in Northern Italy. The farmer reported an increase of number of eggs with shell abnormalities and breakable eggs. The presence of *Mycoplasma synoviae* was confirmed in the oviduct and yolk of abnormal eggs by PCR and cultural methods. *Mycoplasma synoviae* was detected also in both affected flocks by serological techniques but not in a third adjacent flock where no eggshell abnormalities were seen. Treatment with tylosin administered in the drinking water for five days resulted in an immediate improvement of eggshell quality and egg weight with a decrease of economic losses.

Introduzione

Mycoplasma synoviae rappresenta un importante patogeno nel settore avicolo industriale, responsabile sia nel broiler che nel tacchino da carne di forme respiratorie ed articolari spesso complicate da infezioni batteriche secondarie. Il suo ruolo patogeno nel settore delle galline ovaiole risulta ancora controverso, secondo alcuni studi l'infezione da *Mycoplasma synoviae* (MS) in ovaiole può essere correlata a cali dell'ovodeposizione (1), anche se differenti Autori riportano un'assenza di correlazione tra le alterazioni produttive e questo patogeno. Recentemente è stata segnalata una correlazione diretta tra l'infezione di *Mycoplasma synoviae* e la comparsa di una caratteristica alterazione del polo apicale del guscio delle uova, denominata EAA dall'inglese *Eggshell Apex Abnormalities* (1, 2). La lesione localizzata al polo acuto dell'uovo si presenta esternamente di aspetto rugoso di colore differente rispetto alla rimanente parte di guscio e a margini netti, inoltre lo spessore è diminuito con conseguente fragilità dell'area.

Materiali e Metodi

Durante l'anno 2009 in due capannoni (identificati come 2 e 3) di un allevamento intensivo di galline ovaiole nel nord-est Italia, veniva segnalato un aumento del numero di uova rotte e scartate in seguito al rilevamento di alterazioni e irregolarità apicali del guscio quali rugosità, fragilità, assottigliamento e alterata colorazione. Inoltre, lo studio delle tabelle di produzione riferite al capannone 3 ha messo in evidenza una diminuzione media di 3 grammi per uovo rispetto agli standard produttivi. In seguito a tale rilievo sono stati analizzati presso il nostro Istituto campioni di sangue, tamponi tracheali, uova

e alcune carcasse di ogni capannone per eseguire le indagini diagnostiche del caso. I campioni di sangue sono stati analizzati per differenti patogeni tra i quali Bronchite Infettiva (QX, 793B, IT02, M41; metodica inibizione dell'emoagglutinazione), *Egg Drop Syndrome '76* (metodica inibizione dell'emoagglutinazione), *Mycoplasma gallisepticum* (Metodica Elisa, Kit IDEXX), *Mycoplasma synoviae* (Metodica Elisa, Kit IDEXX). I tamponi tracheali sono stati analizzati per la ricerca di *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* mediante metodica PCR. Inoltre dalle carcasse sottoposte ad esame autoptico sono stati eseguiti esami batteriologici generici ed isolamenti specifici per *Mycoplasma* spp., mediante l'utilizzo di terreno Frey modificato sia da ovidutto che da trachea.

Risultati e Discussione

A livello anatomico-patologico non sono state rilevate alterazioni macroscopiche. Le uova campionate presentavano invece caratteristiche lesioni di aspetto rugoso a livello del polo apicale del diametro di circa 2 cm, con margini netti e colore variabile. Tale area inoltre presentava una maggiore fragilità.

Nei due capannoni che presentavano lesioni compatibili con EAA la presenza di *Mycoplasma synoviae* è stata confermata in PCR sia nell'ovidotto che nel 50% delle uova lesionate, oltre che dalla trachea. L'esame colturale specifico per la ricerca di micoplasmi ha dimostrato la presenza di *Mycoplasma synoviae* sia da trachea che da ovidutto del capannone 3 mentre ha dimostrato la presenza di MS solamente da trachea nel capannone 2. Un terzo capannone (capannone 1) non presentante alterazioni riferibili ad EAA è risultato essere negativo per MS.

Sulla base dei risultati di laboratorio solamente il capannone 3 è stato sottoposto a trattamento con tilosina (50g/hl) nell'acqua di bevanda per cinque giorni. Due giorni dopo la fine del trattamento antibiotico non sono più state evidenziate uova con alterazione del guscio e con anomalie del colore. Inoltre si è avuto anche un incremento medio di 1.5 grammi/uovo.

Sulla base dei recenti dati bibliografici (1) la remissione dei segni clinici in seguito alla somministrazione di una terapia specifica per i micoplasmi, congiuntamente ai risultati di laboratorio permette di dimostrare una correlazione tra evento patologico (alterazione del guscio) e la presenza del *Mycoplasma synoviae* in ovidutto.

Conclusioni

Concludendo, il mirato trattamento terapeutico con tilosina ha migliorato la qualità delle uova e determinato un incremento in peso, seppur non permettendo di raggiungere i pesi medi standard. Infine, è possibile ipotizzare la presenza di un ceppo di MS con tropismo specifico per l'ovidotto, poiché la prevalenza di MS in ovidotto sembrerebbe essere correlata con l'incidenza dell'EAA, mentre tale correlazione non sembrerebbe esistere con la prevalenza di MS in trachea.

Bibliografia

1. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 2009 Feb;38(1):77-85.
2. Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Iob L. and Nicholas R. A. J.. Treatment of egg-shell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Diseases: Article In Press.*

PROVA DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEI CONFRONTI DI 70 CEPPI DI *SALMONELLA* SPP. (*S. ENTERITIDIS*, *S. TYPHIMURIUM*, *S. HADAR*, *S. VIRCHOW* E *S. INFANTIS*) DI ORIGINE AVICOLA

Fiorentini L.¹, Taddei R.¹, Massi P.¹, Tosi G.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì*

Abstract

Salmonellosis remains one of the most frequent food-borne diseases worldwide. The emergence of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from food can potentially compromise the treatment of these infections. This investigation was conducted to determine the antibiotic resistance profile of the *Salmonella* isolates. In total 70 strains were investigated. Isolated *Salmonella* were characterized by serotyping and susceptibilities were determined for 22 antimicrobial drugs using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay. All the isolates were susceptible to ofloxacin, amoxicillin-clavulanic acid, cefalotine, cefuroxime, ciprofloxacin, but high rates of resistance were observed for several other drugs, especially for *Salmonella virchow*. This study underlines the need for integrated surveillance systems of antibiotic resistance that consider isolates from the animal reservoirs and the food vehicles.

Riassunto

La Salmonellosi è ancora una delle più frequenti cause di tossinfezione alimentare nel mondo. L'aumento dell'antibiotico-resistenza osservata nei ceppi di *Salmonella* isolati può compromettere il trattamento terapeutico di queste infezioni. Nel corso di questo studio venivano condotte prove di antibiotico-resistenza nei confronti di 70 ceppi di *Salmonella* isolati ed identificati sierologicamente, nel corso dell'attività diagnostica, a partire da matrici di origine avicola. Il saggio di sensibilità agli antibiotici veniva valutato col sistema della Minima Concentrazione Inibente (MIC) utilizzando un pannello di 22 antibiotici. *Salmonella virchow* presentava resistenza del 100% verso un maggior numero di antibiotici rispetto agli altri sierotipi. Alcuni antibiotici fluorochinoloni, β -lattamici e cefalosporine di prima e seconda generazione (ofloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina, cefuroxime, ciprofloxacin), inibivano il 100% dei ceppi impiegati. Questo studio sottolinea la necessità di monitoraggio dell'antibiotico-resistenza dei ceppi patogeni isolati dagli animali e dagli alimenti da essi prodotti.

Introduzione

La salmonellosi è una delle zoonosi di maggior interesse sia dal punto di vista epidemiologico che economico, poiché il patogeno infetta un elevato numero di animali ed è responsabile di numerosi episodi di malattia di origine alimentare nell'uomo. Il rapporto dell'*European Food Safety Authority* (EFSA) 2008, individua la *Salmonella* come seconda causa di tossinfezione alimentare più diffusa nell'uomo in Europa (1). Negli ultimi 50 anni si è assistito ad un aumento sempre più frequente e preoccupante del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, dovuto all'uso indiscriminato e spesso inadeguato di antibiotici, sia in campo umano, per la cura di malattie infettive, sia in quello animale, poiché molti sono i trattamenti di massa in allevamenti intensivi per

la terapia e la profilassi delle infezioni batteriche, con conseguente impossibilità di un accurato controllo della posologia.

Il problema legato all'uso degli antibiotici negli allevamenti non riguarda solo il rischio di permanenza nelle carni di residui, ma anche la selezione di popolazioni batteriche resistenti verso questi principi attivi (4).

Questo studio si propone di valutare l'antibiotico-resistenza in stipti di *Salmonella infantis*, *virchow*, *hadar*, *typhimurium* ed *enteritidis*, isolati da matrici di origine avicola nel corso della routine diagnostica.

Materiali e metodi

Nel corso del 2008, presso il laboratorio di batteriologia della Sezione Diagnostica di Forlì dell'IZSLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna), venivano eseguite prove di antibiotico-resistenza nei confronti di 70 ceppi di *Salmonella* (*S.enteritidis*, *S.Typhimurium*, *S.hadar*, *S.virchow* e *S.infantis*), tutti isolati nel corso dell'attività diagnostica da diverse matrici di origine avicola in circa 5 anni di attività (Tabella 1).

I ceppi venivano identificati come *Salmonella* mediante esame microbiologico con prearricchimento in acqua peptonata tamponata, arricchimento in terreni liquidi selettivi (Rappaport Vassiliadis Soy Broth e brodo selenito), semina in terreno agarizzato (Hektoen Enteric Agar), identificazione biochimica su Kligler Iron Agar (2). Dalla fine del 2007, con metodo microbiologico previsto dalla ISO (*International Standard Organization*) 6579:2002/Amd 1:Annex D: (2007) (3).

I ceppi isolati venivano poi identificati sierologicamente con metodica rapida su vetrino (identificazione degli antigeni somatici O e flagellari H) o con agglutinazione lenta a caldo per la caratterizzazione degli antigeni flagellari (H) secondo lo schema di Kauffmann-White (1).

Il saggio di sensibilità agli antibiotici veniva valutato col sistema della Minima Concentrazione Inibente (MIC) definita come la minima concentrazione, in un range di diluizioni di antibiotico, che inibisce la crescita batterica (6).

Per la prova veniva impiegato un sistema standardizzato MIC DADE BEHRING MICROSCAN[®]: progettato per la medicina umana, costituito da pannelli (piastre *microtiter*) contenenti 1µg di diversi antibiotici disidratati impiegati in campo umano, progettato per determinare la minima concentrazione inibente nei confronti di germi Gram negativi.

ANTIBIOTICI

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1. cefotaxime | 12. cefazolina |
| 2. gentamicina | 13. aztreonam |
| 3. tobramicina | 14. ceftriaxone |
| 4. amikacina | 15. cefepime |
| 5. ofloxacina | 16. ceftazidime |
| 6. norfloxacin | 17. piperacillina + tazobactam |
| 7. amoxicillina + acido clavulanico | 18. piperacillina |
| 8. imipenem | 19. ticarcillina |
| 9. meropenem | 20. cefuroxime |
| 10. ceftaxime | 21. ciprofloxacina |
| 11. cefalotina | 22. ampicillina |

Cefotaxime: cefalosporina battericida di terza generazione (5).

Gentamicina: è un antibiotico amiglicosidico con elevata attività contro batteri Gram positivi e Gram negativi. È un potente inibitore della sintesi proteica, legandosi tenacemente alla subunità 30S dei ribosomi, con frammentazione degli stessi e morte cellulare; questa proprietà condiziona il meccanismo d'azione di tutti gli aminoglicosidi, poiché il loro funzionamento è direttamente connesso alla permeabilità di membrana propria di ogni batterio (5).

Tobramicina: è un antibiotico appartenente alla famiglia degli aminoglicosidi. Viene utilizzato unicamente per via intramuscolare ed endovenosa soprattutto in ambiente ospedaliero per il trattamento di infezioni sostenute da agenti "difficili": ciò in virtù del suo ampio spettro antibatterico (2).

Amikacina: è un antibiotico amiglicosidico di indicazione specifica contro le infezioni da Gram negativi per cui la gentamicina, molecola di prima scelta, non ha dato gli effetti sperati (5).

Ofloxacina/ Norfloxacina: principi attivi che appartengono alla classe dei fluorochinoloni di seconda generazione. Come tutti i chinoloni agiscono interrompendo la replicazione delle molecole dell'acido deossiribonucleico nei batteri. Viene utilizzato come terapia contro infezioni da gram negativi (5).

Amoxicillina: è un antibiotico appartenente alla classe dei β -lattamici al gruppo delle penicilline semisintetiche, viene usata da sola ed in associazione con l'acido clavulanico come antibiotico in molte infezioni sostenute da germi sensibili (5).

Imipenem - Meropenem: sono antibiotici betalattamici ad uso parenterale estremamente attivi con uno spettro esteso praticamente a tutti i germi gram + e gram -, sia aerobi che anaerobi (5).

Cefoxitin: rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di seconda generazione (5).

Cefalotina: rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di prima generazione (5).

Cefazolina: rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di prima generazione (5).

Aztreonam: antibiotico dei monobattami che agisce come le penicilline e le cefalosporine, inibendo la crescita batterica interferendo con la sintesi della parete batterica (5).

Ceftriaxone: è una cefalosporina metossiminica di terza generazione ad ampio spettro, dotata di elevata resistenza alle betalattamasi (5).

Cefepime: è un antibatterico del gruppo delle cefalosporine, di quarta generazione (5).

Piperacillina - Tazobactan: sono antibiotici del gruppo delle penicilline appartenenti alla classe dei β -lattamici (5).

Ticarcillina: è una carbossipenillina (5).

Cefuroxime: rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di seconda generazione (5).

Ciprofloxacina: è il nome generico internazionale di un antibiotico sintetico del gruppo dei fluorochinoloni (5).

Ampicillina: è un antibiotico del gruppo delle penicilline appartenente alla classe dei β -lattamici (5).

Veniva allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame a partire da un'emulsione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario 0.5. Centrifugazione della sospensione per 2-3 secondi. Inoculazione di 0,1 ml di sospensione standardizzata in 25 ml di soluzione fisiologica. Inoculazione di tutti i pozzetti del pannello MIC DADE BEHRING MICROSCAN® con 100 μ l di sospensione batterica per pozzetto. Incubazione per 16-20 ore a 37°C in aerobiosi.

Quindi registrazione della MIC in base all'ultimo pozzetto che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico, le MIC venivano registrate come maggiori-uguali (\geq) rispetto la concentrazione più alta.

Quando non si verificava crescita in tutte le concentrazioni, le MIC venivano registrate come minori o uguali (\leq) alla concentrazione più bassa.

Risultati

I criteri di interpretazione dei risultati quantitativi delle MIC si basavano sui *breakpoints*, indicati e aggiornati dal *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), report 2004 (9) e dal *Comité de Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM), report 2003 (8). La conoscenza dei *breakpoints* dei vari antibiotici considerati permettevano di distinguere le categorie "sensibile e resistente": la sensibilità di un batterio ad un antibiotico è definita come la capacità di un farmaco di inibire la crescita batterica al dosaggio considerato, mentre sono resistenti quelli non inibiti dall'antibiotico testato. (7) (Tabella 2)

I risultati della prova non venivano validati in quanto non si disponeva di ceppi di riferimento di *Salmonella* di origine umana per i quali, inoltre, non si conoscevano i risultati entro valori definiti dal sistema di standardizzazione utilizzato.

Salmonella infantis: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 4 antibiotici (gentamicina, amikacina, meropenem, aztreonam), 1 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (aztreonam). Nessun ceppo risultava resistente a 12 antibiotici (ofloxacina, norfloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, imipenem, cefalotina, ceftriaxone, cefepime, ceftazidime, cefuroxime, ciprofloxacina, ampicillina, ceftaxime) (Grafico 1).

Salmonella virchow: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 8 antibiotici (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, aztreonam, piperacillina e tazobactan, piperacillina, ampicillina), 7 di questi mostravano una percentuale di resistenza del 100% (gentamicina, amikacina, imipenem, aztreonam, piperacillina e tazobactan, piperacillina, ampicillina). Nessun ceppo risultava resistente a 8 antibiotici (ofloxacina, amoxicillina - ac. clavulanico, cefalotina, ceftazidime, ticarcillina, cefuroxime, ciprofloxacina, ceftaxime) (Grafico 2).

Salmonella hadar: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 4 antibiotici (gentamicina, meropenem, ampicillina, ticarcillina), 1 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (ampicillina). Nessun ceppo risultava resistente a 11 antibiotici (cefotaxime, ofloxacina, norfloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, imipenem, cefalotina, cefalozina, piperacillina-tazobactan, piperacillina, cefuroxime, ciprofloxacina) (Grafico 3).

Salmonella typhimurium: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 6 antibiotici (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, piperacillina - tazobactan, ampicillina), 5 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, piperacillina - tazobactan). Nessun ceppo risultava resistente a 12 antibiotici (ofloxacina, norfloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, meropenem, cefalotina, cefalozina, ceftriaxone, cefepime, ceftazidime, piperacillina, cefuroxime, ciprofloxacina) (Grafico 4).

Salmonella enteritidis: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 7 antibiotici (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, meropenem, aztreonam,

ampicillina), 6 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, meropenem, aztreonam). Nessun ceppo risultava resistente a 12 antibiotici (ofloxacina, norfloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina, cefalozina, ceftriaxone, cefepime, piperacillina-tazobactan, piperacillina, cefuroxime, ciprofloxacina, ceftioxin) (Grafico 5).

Conclusioni

Lo studio condotto, limitatamente ai ceppi analizzati, consente di evidenziare i sierotipi di *Salmonella* maggiormente resistenti o sensibili al pannello di antibiotici considerati. *Salmonella virchow* presentava resistenza del 100% verso un maggior numero di antibiotici rispetto agli altri sierotipi. Non si notavano sostanziali differenze considerando i sierotipi con sensibilità pari al 100% verso il maggior numero di antibiotici. Alcuni antibiotici fluorochinoloni, β -lattamici e cefalosporine di prima e seconda generazione (ofloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina, cefuroxime, ciprofloxacina), inibivano il 100% dei ceppi impiegati, indipendentemente dal sierotipo di *Salmonella*.

Gli studi sull'antibiotico-resistenza sono importanti ai fini epidemiologici e della sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici. Sottolineano l'importanza del corretto utilizzo dei farmaci soprattutto negli animali da reddito, indispensabile per garantire l'efficacia delle terapie e limitare l'insorgenza di germi antibiotico-resistenti che potrebbero in seguito contaminare le derrate alimentari di origine animale. E' dunque necessario rafforzare la sorveglianza, implementare lo sviluppo di nuove terapie promuovendo strategie di prevenzione.

Bibliografia

1. "The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008"
2. Zavarella M. Tipizzare le salmonelle. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche; 2001.
3. ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (2007).
4. <http://www.salute.gov.it/farmaciVeterinaripaginaInternaMenuFarmaciVeterinari.jsp>
5. British National Formulary, *Guida all'uso dei farmaci 4 edizione*, Lavis, Agenzia Italiana del Farmaco, 2007.
6. Andrews J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5-16.
7. MacGowan A.P. and Wise R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 17-28.
8. Comité de Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Communiqué 3003 (Editino de Janvier 2003). Société Française de Microbiologie, Paris.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, PA.

Tabella 1. Ceppi di Salmonella isolati e relative matrici.

SALMONELLA INFANTIS		14	Carcassa di tacchino
n.ceppo	matrice	15	Feci pollo
1	Feci di pollo	16	Feci pollo riproduttore
2	Feci pollo		
3	Polvere pollo		
4	Feci di pollo		
5	Feci di pollo		
6	Lettiera pollo		
SALMONELLA VIRCHOW			
n.ceppo	matrice		
1	Piumino di pollo		
2	Tampone ambientale		
3	Carcassa pollo		
4	Tampone ambientale incubatoio		
5	Tampone ambientale incubatoio		
6	Uova embrionale pollo		
7	Tampone ambientale incubatoio		
8	Tampone ambientale incubatoio		
9	Tampone ambientale incubatoio		
10	Feci pollo riproduttore		
11	Fondi scatola pollo		
12	Piumino pollo		
13	Piumino di faraona		
14	Piumino pollo		
15	Piumino pollo		
16	Carcassa pollastra		
SALMONELLA HADAR			
n.ceppo	matrice		
1	Cute di tacchino		
2	Feci di pollo riproduttore		
3	Lettiera pollastra		
4	Carcassa pollo riproduttore		
5	Feci pollo riproduttore		
6	Feci pollo riproduttore		
7	Residui d'incubazione		
8	Feci di tacchino		
9	Carcassa di pollo		
10	Feci di pollo		
11	Piumino pollo		
12	Carcassa pollo		
13	Feci pollo		
SALMONELLA TYPHIMURIUM			
n.ceppo	matrice		
1	Carcassa tacchino		
2	Carcassa starna		
3	Uova embrionata quaglia		
4	Feci pollo riproduttore		
5	Carcassa oca		
6	Carcassa piccione		
7	Carcassa pollo		
8	Carcassa tacchino		
9	Carcassa ovaioia		
10	Carcassa fagiano		
11	Carcassa tacchino		
12	Feci pollastra		
13	Residui di incubazione di pollo		
14	Carcassa pernice Martini		
15	Carcassa di tacchino		
16	Carcassa pollo		
SALMONELLA ENTERITIDIS			
n.ceppo	matrice		
1	Tampone ambientale pollo incubatoio		
2	Piumino di pollo incubatoio		
3	Carcassa di pollo		
4	Carcassa di pollastra		
5	Carcassa pollo		
6	Tampone ambientale pollo incubatoio		
7	Residui d'incubazione		
8	Carcassa pollo boiler		
9	Carcassa pollo pulcini		
10	Carcassa pollo		
11	Carcassa pollo ovaioia		
12	Carcassa pollo		
13	Carcassa pollo		
14	Carcassa pollo		
15	Carcassa pollo		
16	Residui d'incubazione		

Tabella 2. Numero e percentuale di ceppi di Salmonella resistenti.

S. enteritidis	S. typhimurium	S. hadar	S. virchow	S. infantis	SENSIBILE < RESISTENTE ≥	*BREAKPOINT CONCENTRATION PER ENTERO-BACTERIACEAE	PRINCIPI ATTIVI
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	1/6 (17%)	8-64		cefotaxime
16/16 (100%)	16/16 (100%)	11/16 (69%)	16/16 (100%)	5/6 (83%)	4-16		gentamicina
16/16 (100%)	16/16 (100%)	8/16 (50%)	11/16 (69%)	2/6 (33%)	4-16		tobramicina
16/16 (100%)	16/16 (100%)	8/16 (50%)	16/16 (100%)	5/6 (83%)	16-64		amikacina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	2-8		ofloxacina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	0/6 (0%)	4-16		norfloxacina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	4-32		amoxicillina +ac. clavul.
16/16 (100%)	16/16 (100%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	0/6 (0%)	4-16		imipenem
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	0/6 (0%)	4-16		meropenem
0/16 (0%)	0/16 (0%)	3/16 (19%)	2/16 (13%)	0/6 (0%)	8-32		cefoxitin
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	8-32		cefalotina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	1/6 (17%)	8-32		cefazolina
16/16 (100%)	2/16 (13%)	6/16 (38%)	16/16 (100%)	6/6 (100%)	8-32		aztreonam
0/16 (0%)	0/16 (0%)	3/16 (19%)	2/16 (13%)	0/16 (0%)	8-64		ceftriaxone
0/16 (0%)	0/16 (0%)	3/16 (19%)	3/16 (19%)	0/16 (0%)	8-32		cefepime
2/16 (13%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	8-32		cefazidime
0/16 (0%)	16/16 (100%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	1/6 (17%)	16-64		Piperacillina+ tazobactan
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	1/6 (17%)	16-64		piperacillina
2/16 (13%)	2/16 (13%)	12/16 (75%)	0/16 (0%)	1/6 (17%)	8-64		ticarcillina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/6 (17%)	2-16		cefuroxime
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	1-4		ciprofloxacina
10/16 (63%)	14/16 (69%)	16/16 (100%)	16/16 (100%)	0/6 (0%)	4-16		ampicillina

*BREAKPOINT CONCENTRATION: criteri interpretativi secondo il Documento NCCLS M100-S14 e Rapporto 2003 del Comité de Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (8) (9).

Grafico 1

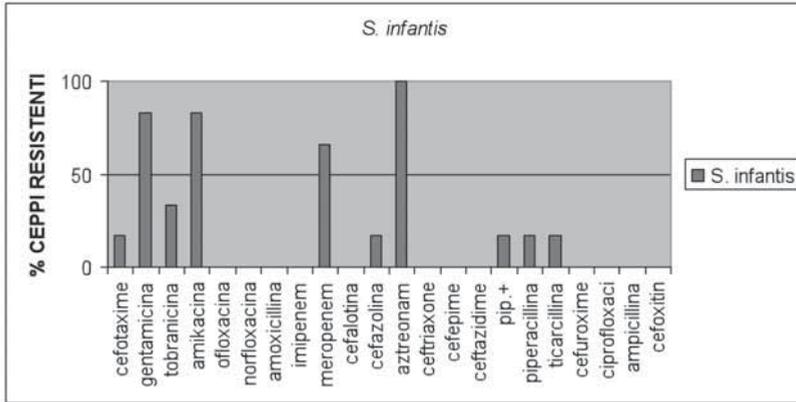


Grafico 2

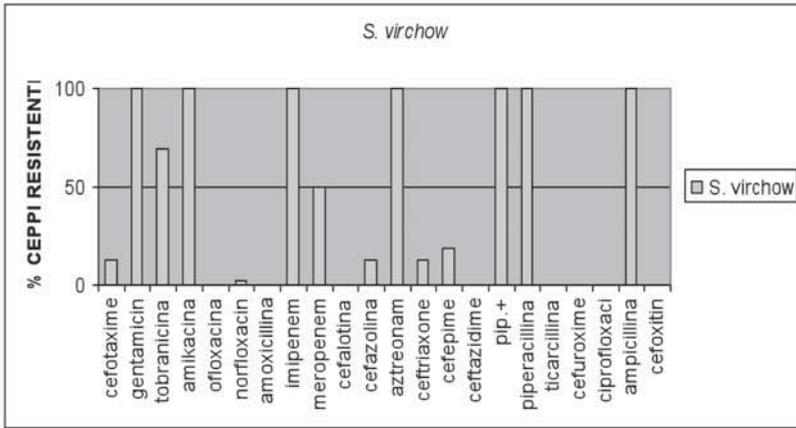


Grafico 3

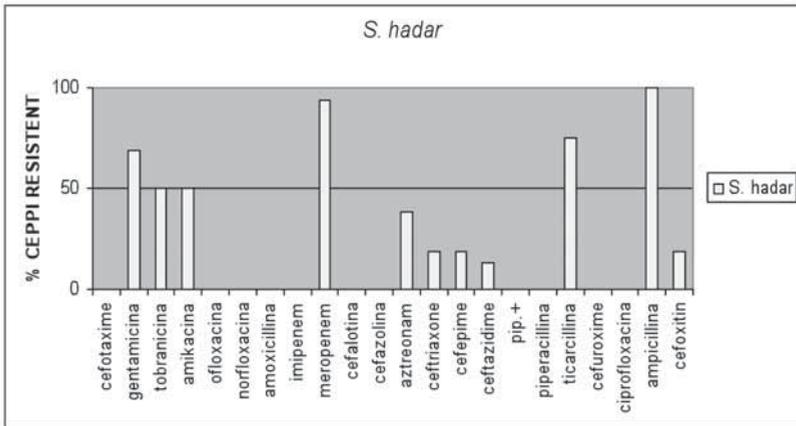


Grafico 4

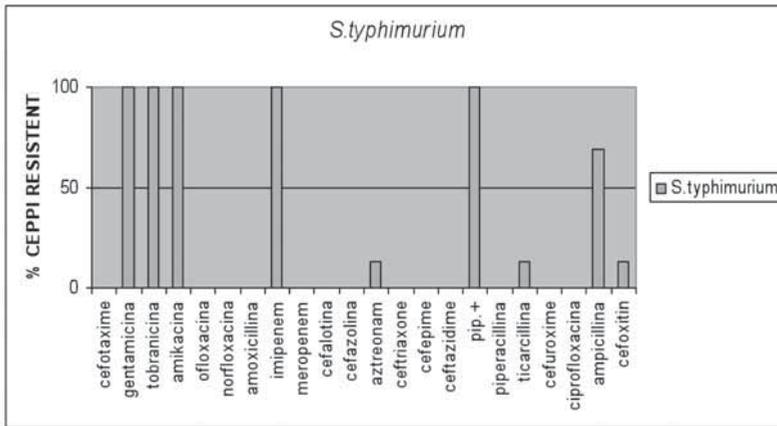
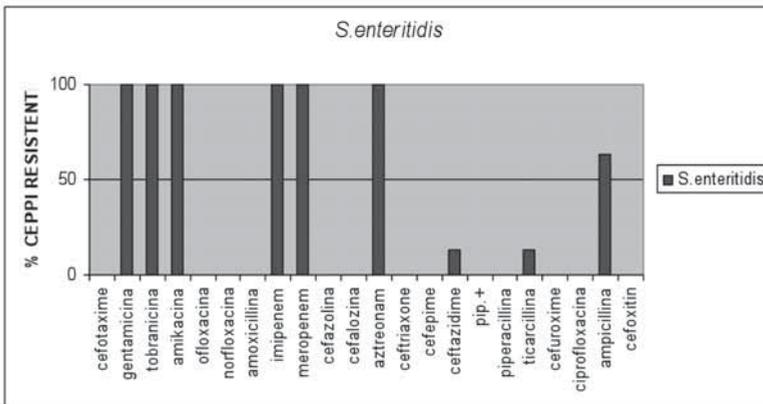


Grafico 5



MERIAL - Uno sguardo lungimirante...

Salmonella Enteritidis
&
Salmonella Typhimurium

chiedi consiglio al tuo Servizio Veterinario



...e le uova sono più sicure

STUDIO SULLA PREVALENZA DELLA SALMONELLA ISOLATA DA MATRICI DI ORIGINE AVICOLA IN TRE ANNI DI ATTIVITÀ DIAGNOSTICA (2007, 2008, 2009)

Fiorentini L.¹, Tosi G.¹, Taddei R.¹, Massi P.¹

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

Abstract

The risk of contamination of avian products with *Salmonella spp.* is well known to the international scientific community. The present study is aimed at evaluating the actual significance of this issue in avian farms. To this purpose, the prevalence of the different serotypes of *Salmonella spp.* isolated from avian specimens during three years of diagnostic activities has been assessed.

Riassunto

Il rischio di contaminazione dei prodotti avicoli da parte di *Salmonella spp.* è noto alla comunità scientifica internazionale. Il seguente studio valuta la prevalenza dei vari sierotipi di *Salmonella* isolati da diverse matrici di origine avicola in tre anni di attività diagnostica, al fine di definire la reale portata del problema negli allevamenti.

Introduzione

La sicurezza biologica dei prodotti di origine animale è un aspetto che da sempre interessa il consumatore. Anche la Comunità Europea, con l'emanazione del Regolamento CE 2160/2003 (1), relativo al "Controllo della *Salmonella* e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti", pone in primo piano l'importante ruolo del pollame quale responsabile della trasmissione all'uomo di microrganismi patogeni. *Salmonella enterica* è ritenuta responsabile di molti casi di zoonosi di origine aviaria (2), nonostante i sistemi di raccolta dei dati epidemiologici, spesso basati sulla sorveglianza passiva, tendano a sottostimare l'incidenza dei casi d'infezione umana.

Attualmente, le misure di controllo previste, sono rappresentate dalla presenza di adeguati piani che prevedono autocontrolli aziendali e controlli ufficiali, atti a garantire il rispetto delle principali misure di biosicurezza ed igiene ed escludere la presenza di eventuali infezioni salmonellari negli allevamenti.

In tale ottica, l'obiettivo primario di questo studio, è quello di valutare la prevalenza della *Salmonella* isolata da campioni di origine avicola negli anni 2007, 2008, 2009 ed individuare le matrici maggiormente incriminate nei diversi casi di positività.

Materiali e metodi

Venivano raccolti ed analizzati i risultati di tre anni di attività diagnostica svolta presso i laboratori della Sezione di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Tali risultati riguardavano le indagini microbiologiche per *Salmonella* condotte a partire da diversi campioni,

tutti prelevati in allevamenti avicoli. Le analisi microbiologiche seguivano diversi protocolli sotto riportati:

- 1) Prearricchimento in terreno liquido non selettivo (Acqua Peptonata Tamponata - Buffered Peptone Water), inoculato con il campione in esame. Arricchimento in terreno liquido selettivo (Brodo Rappaport-Vassiliadis) inoculato con la coltura in pre-arricchimento. Isolamento su terreno solido selettivo (Hektoen Enteric Agar) seminato dal precedente arricchimento. Selezione e trapianto di colonie sospette. Identificazione biochimica e sierologica delle colonie trapiantate (3,4,5).
- 2) Prearricchimento in terreno liquido non selettivo (Acqua Peptonata Tamponata - Buffered Peptone Water), inoculato con il campione in esame. Arricchimento in terreno selettivo semisolido (Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis). Isolamento su piastra (Xilose Lysine Deoxycholate agar e Brilliant Green Agar). Selezione e trapianto di colonie sospette. Identificazione biochimica e sierologica delle colonie trapiantate (6,7,8).
- 3) Prearricchimento in terreno liquido non selettivo (Acqua Peptonata Tamponata - Buffered Peptone Water), arricchimento in terreno liquido selettivo (Rappaport Vassiliadis con soia, Muller-Kauffmann con tetrathionato e novobiocina), isolamento su piastra (Xylose lysine deoxycholate agar e Brilliant Green Agar). Selezione e trapianto di colonie sospette. Identificazione biochimica e sierologica delle colonie trapiantate (6,8,9).

Risultati

I risultati sono riportati nelle tabelle e nei grafici.

Conclusioni

La *Salmonella* è un germe ubiquitario, quindi difficile da eradicare. La profilassi diretta ed indiretta, la sorveglianza ed il monitoraggio, consentono di evidenziare settori critici e di seguire nel tempo l'evoluzione delle infezioni e dei sierotipi circolanti più prevalenti e maggiormente coinvolti nei casi d'infezione umana.

In tre anni di attività dei laboratori di Forlì dell'IZSLER, venivano condotte, a partire da campioni di origine avicola, oltre 30000 indagini microbiologiche per *Salmonella* di cui 1113 (3,6%) conferimenti risultavano positivi.

Sierotipi maggiormente prevalenti:

anno 2009 *S. livingstone*, *S. Kentucky*, *S. muenchen*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. bredeney*

anno 2008 *S. hadar*, *S. enteritidis*, *S. muenchen*, *S. bredeney*, *S. montevideo* e *S. livingstone*

anno 2007 *S. enteritidis*, *S. hadar*, *S. bredeney*, *S. typhimurium*, *S. virchow*, *S. muenchen*

Matrici maggiormente incriminate:

anno 2009 polvere, materia prima (soja), meconio e mangime

anno 2008 visceri, materia prima (soja), acqua di abbeverata, piumino e polvere

anno 2007 visceri, materia prima (soja), polvere e sovrascarpe

I risultati portano a sottolineare come le materie prime siano importanti fonti di contaminazione spesso correlate epidemiologicamente nei casi d'infezione negli animali.

Per concludere, è noto come l'introduzione di *Salmonelle* in allevamento possa avvenire attraverso animali infetti, contatto con animali selvatici e domestici, ma soprattutto per contaminazione ambientale. Da ciò si deduce come acqua e mangime rappresentino un'importante fonte di contaminazione. Le misure preventive per evitare la loro contaminazione sono rappresentate dal controllo delle materie prime e dall'applicazione di rigide misure igieniche durante la loro preparazione. L'efficacia dei controlli, inoltre, non può prescindere da una corretta identificazione degli animali infetti. Un approccio valido è quello di eseguire costanti monitoraggi attraverso accurati prelievi e controlli microbiologici.

Bibliografia

- 1) Regolamento (CE) N. 2160/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sul controllo della Salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti (GU L325 del 12/12/2003 pag. 1-15)
- 2) "The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008"
- 3) The American Association of Avian Pathologists: "A laboratory Manual For The Isolation and Identification of Avian Pathogens" – third edition- 1989
- 4) G.R. Carter, J.R. Cole: "Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Microbiology and Micology – fifth edition- 1990
- 5) O.I.E. : "Manual of Standards for Diagnostic Tests And Vaccines" – fifth edition- 2004
- 6) ISO 6579:2002 "Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal method for the detection of Salmonella spp. " Tecnical corrigendum 1:2004
- 7) ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D: Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (2007)
- 8) Zavanella M. Tipizzare le salmonelle. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche; 2001
- 9) ISO 6579:2002 "Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal method for the detection of Salmonella spp" (2002)

Tabella 1. Salmonelle 2007.

ANNO 2007		
N. TOT ANALISI PER SALMONELLA: 9224		
N TOT. POSITIVI e % di positività: 284 (3%)		
TIPO DI MATRICE	TOTALE ANALIZZATE	TOTALI POSITIVE PER SALMONELLA (%) DI POSITIVITA'
visceri	44	8 (18)
materia prima (soja)	35	5 (14)
polvere	136	14 (10)
sovrascarpe	67	7 (10)
paglia	14	1 (7)
piumino	658	30 (5)
feci	1579	7 (5)
tamponi	570	21 (4)
carcasse	2288	75 (3)
meconio	119	3 (3)
pulcini 1g.	527	9 (2)
fondi scatola	419	9 (2)
lettiera	44	1 (2)
acqua di abbeverata	58	1 (2)
mangime	426	7 (2)
uova embrionate	368	3 (1)
residui di inc.	1916	16 (1)
SIEROTIPO TOTALE POSITIVI (% DI PREVALENZA) sul totale analisi <i>Salmonella</i>	MATRICE D'ISOLAMENTO	N° MATRICI POSITIVE
S. enteritidis 40 (0,4)	Carcasse	24
	Feci	4
	Visceri	4
	Tamponi	2
	Residui inc.	2
	Sovrascarpe	2
	Polvere	1
	Fondi scatola	1

<p>S. hadar 39 (0,4)</p>	<p>Feci Carcasse Sovrascarpe Piumino Residui inc. Pulcini 1g. Tamponi Fondi scatola Lettiera</p>	<p>18 7 4 3 2 2 1 1 1</p>
<p>S. bredeney 35 (0,4)</p>	<p>Carcasse Piumino Feci Polvere Residui inc. Fondi scatola Tamponi</p>	<p>10 9 9 4 1 1 1</p>
<p>S. typhimurium 27 (0,3)</p>	<p>Carcasse Feci Polvere Residui inc. Piumino Acqua abbev. Mangime Meconio visceri</p>	<p>11 7 2 2 1 1 1 1 1</p>
<p>S. virchow 23 (0,2)</p>	<p>Piumino Carcasse Feci Tamponi Pulcini 1g. Residui inc. Fondi scatola</p>	<p>8 3 3 3 2 2 2</p>
<p>S. muenchen 22 (0,2)</p>	<p>Feci Carcasse Piumino Pulcini 1g. Polvere Tamponi Paglia</p>	<p>8 4 3 2 2 2 1</p>
<p>S. livingstone 21 (0,2)</p>	<p>Residui inc. Tamponi Carcasse Feci Pulcini 1g. Piumino Fondi scatola</p>	<p>6 5 4 2 2 1 1</p>

S. newport 13 (0,1)	fece Polvere Carcasse Residui inc. piumino	6 3 2 1 1
S.heidelberg 9 (0,1)	Piumino Tamponi Pulcini 1g. Meconio Visceri Feci Fondi scatola	2 2 1 1 1 1 1
S. corvallis 9 (0,1)	Tamponi Uova embrionate Fondi scatola fece	5 2 1 1
S. blockley 5 (0,05)	carcasse	5
S.isangi 5	Mangime Feci Uova embrionate	2 2 1
S.kentucky 5 (0,05)	Polvere Feci carcasse	2 2 1
S. saintpaul 4 (0,04)	Carcasse Feci tamponi	2 1 1
S. mbandaka 3 (0,03)	Sovrascarpe Materia prima (soja) fece	1 1 1
S. kedougou 3 (0,03)	Materia prima (soja) mangima	2 1
S. indiana 3 (0,03)	Visceri carcasse	2 1
S. senftenberg 3 (0,03)	Tamponi Feci meconio	1 1 1

S. agona 3 (0,03)	Feci Piumino Fondi scatola	1 1 1
S. tennessee 2 (0,02)	Materia prima (soja) mangime	1 1
S. oranienburg 2 (0,02)	Feci	2
S. ferruc 1 (0,01)	Tamponi	1
S. grumpensis 1	Piumino	1
S. guilford 1 (0,01)	Feci	1
S. london 1 (0,01)	Carcasse	1
S. havana 1 (0,01)	Materia prima (soja)	1
S. mishmarhaemek 1 (0,01)	Mangime	1
S. montevideo 1 (0,01)	Mangime	1
S. thompson 1 (0,01)	Feci	1

Tabella 2. Salmonelle 2008.

ANNO 2008		
N. TOT ANALISI PER SALMONELLA: 10331		
N TOT. POSITIVI e (% di positività): 375 (3,6%)		
TIPO DI MATRICE	TOTALE ANALIZZATE	TOTALI MATRICI POSITIVE PER SALMONELLA (%) DI POSITIVITA'
Visceri	27	4 (27)
Materia prima	56	6 (11)
Acqua di abbeverata	9	1 (11)
Piumino	82	8 (10)
Polvere	101	9 (9)
Feci	2005	105 (5)
Gusci	903	41 (5)
Mangime	275	11 (4)
Carcasse	2238	65 (3)
Fondi scatola	439	13 (3)
Sovrascarpe	932	23 (3)
Uova embr.	372	11 (3)
Pulcini 1g.	429	11 (3)
Tamponi	664	21 (3)
Paglia	33	1 (1)
Residui inc.	1692	33 (2)
Meconio	74	1 (1)
SIEROTIPO TOTALE POSITIVI (% DI PREVALENZA) sul totale analisi <i>Salmonella</i>	MATRICE D'ISOLAMENTO	N° MATRICI POSITIVE
S. hadar 49 (0,5)	Feci	12
	Carcasse	9
	Sovrascarpe	9
	Gusci	5
	Fondi scatola	5
	Residui incub.	4
	Uova embr.	2
	Pulcini 1g.	2
Tamponi	1	

<p>S. enteritidis 44 (0,4)</p>	<p>Feci Carcasse Tamponi Uova embr. Visceri Pulcini 1g Fondi scatola Sovrascarpe Polvere</p>	<p>17 14 3 3 2 2 1 1 1</p>
<p>S. muenchen 43 (0,4)</p>	<p>Feci Carcasse Gusci Tamponi Fondi scatola Residui inc. Polvere Acqua abbev. Mangime</p>	<p>15 9 8 3 3 2 1 1 1</p>
<p>S. bredeney 41 (0,4)</p>	<p>Gusci Carcasse Feci Piumino Sovrascarpe Residui di inc. Mangime Paglia Tamponi Fondi scatola Pulcini 1g.</p>	<p>11 9 9 3 2 2 1 1 1 1 1</p>
<p>S. montevideo 33 (0,3)</p>	<p>Carcasse Gusci Feci Uova embr. Residui inc. Sovrascarpe Pulcini 1g. Mangime Tamponi Fondi scatola</p>	<p>7 6 5 5 2 2 2 2 1 1</p>
<p>S. livingstone 33 (0,3)</p>	<p>Residui inc. Tamponi Gusci Piumino Carcasse Fondi scatola Pulcini 1g Meconio Feci</p>	<p>10 6 4 3 3 2 2 1 1</p>

S. typhimurium 18 (0,2)	Carcasse Feci Gusci Visceri Polvere Mangime Residui inc.	7 4 2 2 1 1 1
S. agona 16 (0,2)	Feci Gusci Polvere Sovrascarpe Tamponi Residui inc.	8 3 2 1 1 1
S.kenuchy 14 (0,1)	Feci Carcasse Sovrascarpe Tamponi Polvere Uova embr. Materia prima (soja)	5 3 2 1 1 1 1
S. Newport 12 (0,1)	Feci Tamponi Sovrascarpe Polvere Carcasse Residui	5 2 2 1 1 1
S. anatum 7 (0,07)	Soprascarpe Residui inc. Feci Tamponi	3 2 1 1
S. infantis 6 (0,06)	Piumino Residui inc. Sovrascarpe Gusci	2 2 1 1
S. schwarzengrund 6 (0,06)	Feci gusci	5 1
S. thompson 6 (0,06)	Feci Carcasse Pulcini 1g.	4 1 1
S. virchow 6 (0,06)	Feci Carcasse tamponi	4 1 1

S. kedougou 5 (0,05)	Mangime Carcasse Materia prima (soja)	3 1 1
S. braedenburg 4 (0,04)	Residui inc. Carcasse	3 1
S. derby 4 (0,04)	Residui inc. Feci Pulcini 1g. Tamponi	1 1 1 1
S. heidelberg 4 (0,04)	Feci Carasse Polvere	2 1 1
S. blockley 3 (0,03)	Residui inc.	3
S. saintpaul 3 (0,03)	Feci Carcasse	2 1
S. baenderup 2 (0,02)	Feci	2
S. london 2 (0,02)	Residui inc. Carcasse	1 1
S. mbandaka 2 (0,02)	Mangime	2
S. oranienburg 2 (0,02)	Materia prima (soja)	2
S. senftenberg 2 (0,02)	Feci Mangime	1 1
S. coeln 1 (0,001)	Feci	1
S. guarapiranga 1 (0,001)	Materia prima (soja)	1

S.indiana 1 (0,001)	Residui inc.	1
S. isangi 1 (0,001)	Feci	1
S.krefeld 1 (0,001)	Carcasse	1
S. moade 1 (0,001)	Carcasse	1
S. orion 1 (0,001)	Materia prima (soja)	1
S. umbilo 1 (0,001)	Sovrascarpe	1
S. yoruba 1 (0,001)	Polvere	1

Tabella 3. Salmonelle 2009.

ANNO 2009 N. TOT ANALISI PER SALMONELLA: 11415 N TOT. POSITIVI e (% di positività): 454 (4%)		
TIPO DI MATRICE	TOTALE ANALIZZATE	TOTALI MATRICI POSITIVE PER SALMONELLA (%) DI POSITIVITA'
Polvere	76	12 (15)
Materia prima soja	85	10 (12)
Meconio	63	7 (11)
Mangime	218	15 (7)
Feci	2584	140 (5)
Visceri	58	3 (5)
Tamponi	685	34 (5)
Fondi scatola	386	18 (5)
Piumino	75	4 (5)
Gusci	1056	52 (5)
Carcasse	1460	44 (3)
Residui inc.	1471	47 (3)
Soprascarpe	2464	42 (2)
uova embr.	393	7 (2)
pulcini 1g.	341	7 (2)
SIEROTIPO TOTALE POSITIVI (% DI PREVALENZA) sul totale analisi <i>Salmonella</i>	MATRICE D'ISOLAMENTO	N° MATRICI POSITIVE (% di positività rispetto al n. totale di matrici analizzate nel 2009)
S. Livingstone 113 (1)	Residui inc. Gusci Sovrascarpe Meconio Uova embr. Fondi scatola Pulcini 1g. Tamponi Carcasse Piumino Feci Polvere Mangime Materia prima (soja)	39 26 8 7 7 6 5 4 3 3 2 1 1 1

S. Kentucky 58 (0,5)	Feci Tamponi Polvere Sovrascarpe Fondi scatola Pulcini 1g. Mangime	38 10 4 3 1 1 1
S. muenchen 38 (0,3)	Feci Mangime Sovrascarpe Polvere Tamponi	23 9 3 2 1
S. typhiurium 36 (0,3)	Carcasse Residui inc. Tamponi Feci Visceri Gusci Materia prima (soja) Polvere	16 5 4 4 2 2 2 1
S enteritidis 32 (0,3)	Feci Sovrascarpe Gusci Tamponi Carcasse Polvere Pulcini 1g.	10 8 4 4 3 2 1
S. bredeney 27 (0,2)	Feci Carcasse Gusci Sovrascarpe Tamponi	15 6 4 1 1
S. hadar 19 (0,2)	Sovrascarpe Feci Carcasse Tamponi	12 4 2 1
S. monteideo 19 (0,2)	Gusci Feci Sovrascarpe Residui inc. Tamponi Carcasse Materia prima (soja)	5 5 3 2 2 1 1
S. infantis 16 (0,1)	Feci Sovrascarpe Gusci Materia prima (soja)	7 4 4 1

S. mbandaka 15 (0,1)	Feci Mangime Matera prima (soja) Carcasse Tamponi Gusci sovrascarpe	7 2 2 1 1 1 1
S. agona 9 (0,1)	Feci Carcasse Mangime sovrascarpe	4 2 2 1
S.london 9 (0,1)	carcasse	9
S. heidelberg 8 (0,1)	Feci Polvere carcasse	6 1 1
S. Thompson 8	Sovrascarpe Gusci	6 2
S. braenderup 4 (0,03)	Feci Tamponi	3 1
S. coeln 4 (0,03)	Coeln	4
S. isangi 4 (0,03)	Feci Sovrascarpe	2 2
S. Newport 4 (0,03)	Tamponi Sovrascarpe Residui inc.	2 1 1
S. kottbus 3 (0,02)	Gusci Tamponi	2 1
S.schwarzengrund 3 (0,02)	Matera prima (soja) Sovrascarpe	2 1
S. senftenberg 3 (0,02)	Fondi scatola Piumino Gusci	1 1 1

S. virchow 3 (0,02)	feci	3
S. adabraka 2 (0,02)	Feci Sovrascarpe	1 1
S.corvallis 2 (0,02)	Feci Polvere	1 1
S. rissen 2 (0,02)	Feci	2
S. tennessee 2 (0,02)	Feci Matera prima (soja)	1 1
S.worthingtong 2 (0,02)	Feci Polvere	1 1
S. indiana 1 (0,01)	Carcasse	1
S. blockley 1 (0,01)	Gusci	1
S. cerro 1 (0,01)	Polvere	1
S. kedougou 1 (0,01)	Matera prima (soja)	1
S. muenster 1 (0,01)	Feci	1
S. oranienburg 1 (0,01)	Matera prima (soja)	1
S. saintpaul 1 (0,01)	Visceri	1
S. veneziana 1 (0,01)	Tamponi	1
S. wangata 1 (0,01)	Tamponi	1

Grafico 1. *Salmonelle* isolate da matrici avicole anno 2007.

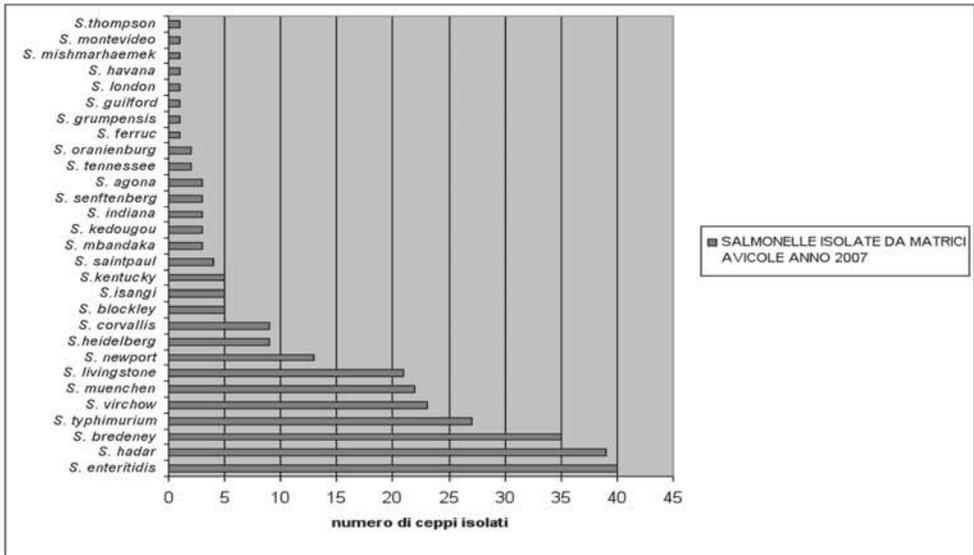


Grafico 2. *Salmonelle* isolate da matrici avicole anno 2008.

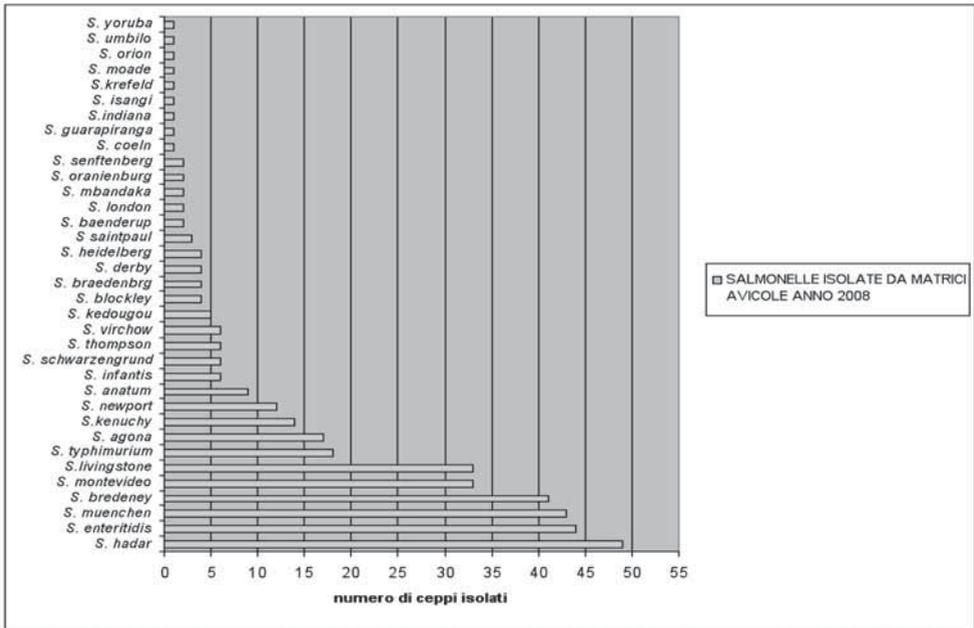
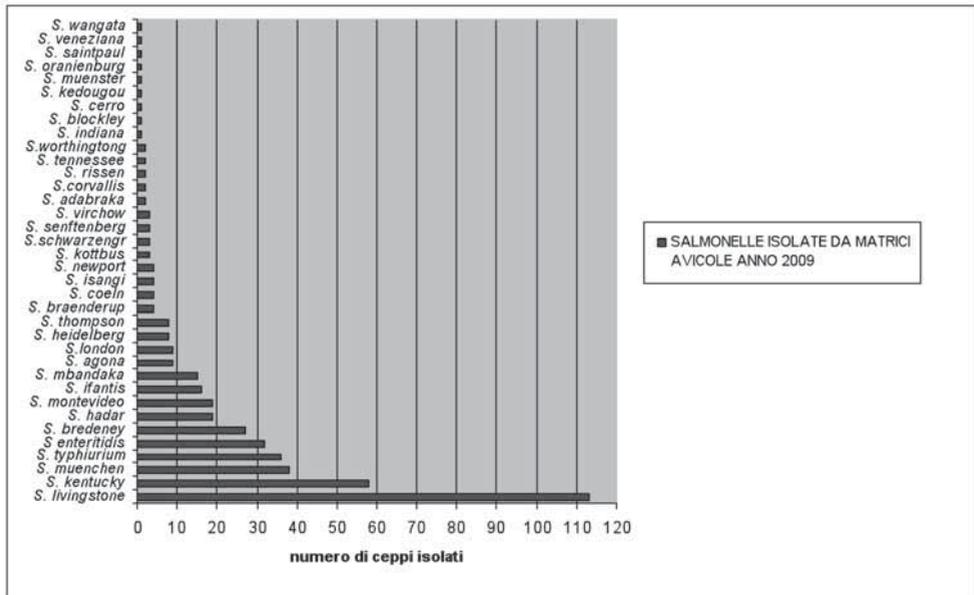


Grafico 3. *Salmonelle* isolate da matrici avicole anno 2009.



INDAGINE SULLA PRESENZA E LA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI *CAMPYLOBACTER* TERMOFILICI ISOLATI DA POLLI BROILER IN NORD ITALIA

Giacomelli M., Menandro M.L., Pasotto D., Piccirillo A.

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)

Summary

Thermophilic *Campylobacter* spp. infections are the main cause of human bacterial gastroenteritis worldwide, and currently representing a relevant public health problem. Furthermore, an increasing number of thermophilic *Campylobacter* isolated from animals, humans and foodstuffs is resistant to antimicrobial drugs commonly used in therapy of human campylobacteriosis. Since the leading role of poultry in transmitting the infection to humans, this study was carried out to evaluate the presence and the antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* spp. in commercial broiler farms in Northern Italy. A total of 200 cloacal swabs from 10 chicken flocks were examined. Seven chicken flocks were positive for thermophilic *Campylobacter*. *C. jejuni* was detected in 63.8% of positive samples and *C. coli* in 36.2%. The agar disk diffusion method (Kirby-Bauer, 1966) was used to test the susceptibility to 20 antimicrobial drugs of 36 *C. jejuni* isolates and 21 *C. coli* isolates. All isolates showed resistance to multiple antimicrobial drugs. Most isolates were resistant to quinolones, ampicillin and cephalosporins. A number of isolates was also resistant to oxytetracycline and sulphametoxazole+trimethoprim. Most isolates were susceptible to aminoglycosides, amoxicillin+clavulanic acid and cefotaxime, and all susceptible to chloramphenicol. Susceptibility to macrolides, clindamycin, oxytetracycline and streptomycin was different between *C. coli* and *C. jejuni*. Particularly, most of *C. coli* isolates were resistant to macrolides and clindamycin, while most *C. jejuni* were susceptible. This study showed a widespread presence of thermophilic *Campylobacter* in commercial broilers and a high occurrence of antimicrobial resistance among them. Chicken meat represents one of the main sources of food-borne infection in humans and antimicrobial resistant isolates could be transmitted to humans through food. Therefore, antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter* strains should be strictly monitored due to the relevant impact on public health.

Introduzione

La campilobatteriosi, zoonosi provocata dalle specie termofile di *Campylobacter*, attualmente rappresenta un notevole problema di Sanità Pubblica. Le specie termofile di *Campylobacter*, riconosciute responsabili di malattia diarroica nell'uomo fin dagli anni '70, sono infatti i principali agenti di gastroenterite batterica a livello mondiale, con 190.566 casi umani confermati nell'Unione Europea nel 2008 (EFSA, 2010) e 2,4 milioni di casi annui stimati negli Stati Uniti (<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>).

Il serbatoio dell'infezione è rappresentato dal tratto gastroenterico di numerosi mammiferi e uccelli domestici e selvatici, che albergano *Campylobacter* spp. senza

manifestare alcuna sintomatologia e lo eliminano tramite le feci in quantità elevata. Tra le numerose specie *reservoir*, i volatili da reddito rivestono un ruolo di rilievo nella trasmissione dell'infezione all'uomo. Infatti, non solo essi sono il serbatoio principale del microrganismo, ma il consumo di carne di pollo (soprattutto poco cotta) rappresenta il principale fattore di rischio nella trasmissione dell'infezione all'uomo (Wingstrand *et al.*, 2006).

Nella maggior parte dei casi le infezioni da *Campylobacter* spp. sono autolimitanti, ma talvolta, soprattutto in bambini, anziani ed in pazienti immunodepressi, possono manifestarsi con quadri di enterite acuta e prolungata e nell'1% dei casi dare infezioni extraintestinali, che necessitano di terapia antibiotica (van Hees *et al.*, 2007). Gli antibiotici di prima scelta nella terapia delle forme gravi o complicate di campilobatteriosi umana sono i macrolidi, seguiti dai chinoloni e dalle tetracicline. Si tratta di molecole impiegate anche in ambito veterinario e nei confronti delle quali un numero sempre maggiore di *Campylobacter* spp., isolati sia dagli animali che dall'uomo, sta sviluppando resistenza.

Date le importanti implicazioni di Sanità Pubblica dell'infezione da *Campylobacter* termofili nelle specie avicole, si è voluta indagare la loro presenza in allevamenti intensivi di polli broiler del Nord Italia e la loro sensibilità ad un *panel* di antibiotici.

Materiali e metodi

Campionamento

Nei mesi di marzo e aprile 2009 sono stati sottoposti a campionamento 10 gruppi di polli broiler di età compresa tra 22 e 50 giorni, appartenenti a 7 differenti allevamenti intensivi. In alcuni allevamenti sono stati controllati più gruppi di animali, perché costituiti da soggetti di età o provenienza diversa. Gli allevamenti considerati erano dislocati nelle province di Brescia, Cremona, Treviso - province nelle quali è stato esaminato un gruppo di soggetti - e Verona, dove sono stati esaminati 7 gruppi provenienti da 4 allevamenti. In ciascun gruppo è stato eseguito un tampone cloacale a 20 soggetti scelti casualmente. I tamponi sono stati immediatamente collocati in provette sterili contenenti il terreno di trasporto Amies con carbone (Copan, Brescia, Italia) e conservati in borsa termica fino all'arrivo al laboratorio, che è avvenuto entro due-tre ore dal prelievo. Una volta pervenuti in laboratorio, i campioni sono stati immediatamente processati.

Isolamento e identificazione

Per l'isolamento di *Campylobacter* termofili sono state seguite le linee guida dell'*Office International des Epizooties* (OIE, 2008), utilizzando il Preston Broth (OXOID, Basingstoke, UK) come brodo di arricchimento selettivo, e il Karmali agar (OXOID) come terreno selettivo. Ciascun tampone è stato processato e quindi analizzato singolarmente. Per la semina su Karmali agar è stato adottato il metodo delle membrane filtranti descritto da Steele e McDermott (1984), applicato al brodo di arricchimento dopo 24 ore di incubazione in microaerofilia a 41,5°C. A tale scopo sono state utilizzate membrane filtranti con pori del diametro di 0,45 µm (Whatman, Maidstone, UK). In tutte le fasi della processazione, i campioni sono stati incubati

a una temperatura di 41,5°C e in atmosfera microaerofila ottenuta in giare per anaerobiosi mediante i generatori CampyGen® (OXOID).

L'identificazione di specie degli isolati è stata eseguita mediante i test della catalasi (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), idrolisi dell'ippurato (Sigma-Aldrich, Irvine, UK), idrolisi dell'indoxil acetato (OXOID) e mediante la valutazione della sensibilità all'acido nalidixico e alla cefalotina (OXOID). L'identificazione degli isolati a livello di genere e specie è stata confermata mediante *multiplex* PCR, secondo il protocollo descritto da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007). L'estrazione del DNA è avvenuta mediante bollitura per 20 minuti di un'ansata di coltura batterica stemperata in 1 ml di acqua distillata sterile. Per la composizione della miscela di reazione, la concentrazione dei *primer* e la quantità di DNA sottoposti ad analisi sono state seguite le indicazioni fornite dagli autori (Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007).

Nell'esecuzione dei test sono stati utilizzati i seguenti ceppi di controllo positivi: *C. jejuni* ATCC 33291, *C. coli* CIP 70.80, *C. lari* CIP 102722 e *C. upsaliensis* CIP 103681.

Valutazione della sensibilità agli antibiotici

I ceppi isolati sono stati sottoposti ad antibiogramma mediante il metodo di diffusione in piastra di Kirby-Bauer (1966), che prevede l'allestimento di una sospensione batterica in soluzione fisiologica sterile, fino a ottenere una torbidità corrispondente allo 0,5 della scala di McFarland, e l'inoculo in Mueller-Hinton agar (OXOID) addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID). Le piastre sono state quindi incubate a 37°C per 48 ore in microaerofilia. Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo *C. jejuni* ATCC 33560.

Nel *panel* di antibiotici e chemioterapici testati sono stati inclusi quelli raccomandati dall'*European Food Safety Authority* (EFSA, 2007a) relativamente a *C. coli* e *C. jejuni* e quelli più utilizzati in avicoltura e nella terapia della campilobatteriosi umana, come riportato nell'elenco seguente:

- Aminoglicosidi
 - apramicina 15 µg (OXOID)
 - gentamicina 10 µg (OXOID)
 - streptomycin 10 µg (OXOID)
- Cefalosporine
 - cefalotina 30 µg (OXOID)
 - cefotaxime 30 µg (OXOID)
 - ceftiofur 30 µg (OXOID)
 - cefuroxime 30 µg (OXOID)
- Penicilline
 - ampicillina 10 µg (OXOID)
 - amoxicillina+acido clavulanico 30 µg (OXOID)
- Chinoloni
 - acido nalidixico 30 µg (OXOID)
 - flumequina 30 µg (OXOID)
 - enrofloxacin 5 µg (OXOID)
 - ciprofloxacina 5 µg (OXOID)
- Lincosamidi
 - clindamicina 2 µg (OXOID)

- Macrolidi
 - eritromicina 15 µg (OXOID)
 - tilmicosina 15 µg (Bio-Rad, Marnes la Coquette, Francia)
 - tilosina 30 µg (Mast Diagnostics Ltd., Merseyside, UK)
- Sulfamidici + diaminopirimidine
 - sulfametossazolo+trimethoprim 25 µg (OXOID)
- Tetraciclina
 - ossitetraciclina 30 µg (OXOID)
- Fenicoli
 - cloramfenicolo 30 µg (OXOID)

Per l'interpretazione dei risultati sono state seguite le indicazioni fornite dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2007).

Risultati

Isolamento e identificazione

Dei 10 gruppi campionati, 7 sono risultati positivi a *Campylobacter* termofili. In particolare, la positività è stata rilevata nei gruppi di Brescia e Cremona, e in cinque gruppi appartenenti ad allevamenti ubicati nella provincia di Verona. Dei microrganismi isolati, 44 sono stati identificati come *C. jejuni* (63,8%), mentre i restanti 25 (36,2%) come *C. coli*. In cinque gruppi è stata riscontrata la presenza contemporanea di entrambe le specie del microrganismo, con la prevalenza di *C. jejuni* in tre di essi e di *C. coli* negli altri due. In due gruppi invece è stata isolata o solo la prima o solo la seconda delle due specie (tabella 1).

Valutazione della sensibilità agli antibiotici

Sono stati testati 36 isolati di *C. jejuni* e 21 di *C. coli*. La prevalenza della sensibilità e dell'antibiotico-resistenza da parte degli isolati è riportata nella tabella 2 e nelle figure 1 e 2.

Gli antibiogrammi hanno permesso di rilevare una notevole resistenza nei confronti dei chinoloni, sia di prima sia di seconda generazione, con la totalità dei ceppi resistenti a flumequina e ciprofloxacina, il 95% di essi resistente all'acido nalidixico e il 75% resistente all'enrofloxacin. La resistenza prevaleva, in misura inferiore, anche nei confronti dell'ossitetraciclina (con il 67% dei ceppi resistenti) e dell'associazione sulfametossazolo+trimethoprim (68% dei ceppi resistenti). Nell'ambito degli antibiotici beta-lattamici è stata riscontrata una resistenza molto elevata nei confronti dell'ampicillina (96%) e delle cefalosporine, con tutti gli isolati resistenti a cefalotina e cefuroxime e il 96% al ceftiofur. Per quanto riguarda l'associazione amoxicillina+acido clavulanico è prevalsa la sensibilità (77% dei ceppi), così come, anche se in misura inferiore (61%), nei confronti del cefotaxime, una cefalosporina di terza generazione. Una spiccata sensibilità è stata rilevata nei confronti degli aminoglicosidi, con tutti gli isolati sensibili all'apramicina, il 96% alla gentamicina e l'82% alla streptomina. La sensibilità è stata totale anche nei confronti del cloramfenicolo.

I ceppi di *C. coli* e di *C. jejuni* analizzati hanno mostrato un profilo di antibiotico-resistenza simile, tranne che per macrolidi, clindamicina, ossitetraciclina e streptomina. Infatti, mentre più dell'80% dei ceppi di *C. jejuni* era sensibile alla

clindamicina (83%) e ai macrolidi (eritromicina: 83%; tilmicosina: 89%; tilosina: 86%), il 95% degli isolati di *C. coli* era resistente alle stesse molecole. Per quanto riguarda l'ossitetraciclina, la percentuale di ceppi resistenti era pari al 95% per *C. coli* e al 50% per *C. jejuni*. Per la streptomina, invece, la percentuale di ceppi sensibili era del 57% per *C. coli* e del 97% per *C. jejuni*.

Tutti i ceppi isolati hanno mostrato multi-resistenza: *C. jejuni* nei confronti di un minimo di 7 fino ad un massimo di 15 antibiotici, *C. coli* nei confronti di un minimo di 11 fino ad un massimo di 16 molecole. Per entrambe le specie di *Campylobacter* il pattern minimo di multi-resistenza comprendeva una cefalosporina di prima generazione (cefalotina) e una di seconda generazione (cefuroxime) e due rappresentanti dei chinoloni (ciprofloxacina e flumequina).

Discussione

In questo studio è stata rilevata la presenza di *Campylobacter* spp. in 7 gruppi di broiler su 10 campionati, a conferma dell'ampia diffusione del microrganismo in questa specie avicola (EFSA, 2010). La maggior parte degli isolati, pari al 63,8%, apparteneva alla specie *C. jejuni*, coerentemente con quanto già riportato in letteratura circa la predominanza di questa specie negli avicoli (Newell e Wagenaar, 2000; Sahin *et al.*, 2002). È tuttavia degno di nota il fatto che *C. coli* fosse l'unica specie riscontrata in un gruppo e che prevalesse in altri due.

Dalla valutazione degli antibiogrammi è emerso che la maggioranza dei ceppi isolati ha presentato resistenza nei confronti di molte delle molecole testate, in particolare di quelle più utilizzate in terapia umana. Infatti, è stata rilevata una resistenza significativa nei confronti dei macrolidi (seppur con notevoli differenze tra *C. coli* e *C. jejuni*) e dei fluorochinoloni, che sono considerate le molecole di prima scelta nel trattamento della campilobatteriosi umana. Inoltre, si è rilevata una resistenza significativa anche nei confronti della clindamicina (lincosamide), somministrata soprattutto ai bambini, e dell'ossitetraciclina, la cui classe di appartenenza rappresenta la seconda scelta in terapia umana ed è molto utilizzata nei Paesi in via di sviluppo per il suo costo limitato (Aarestrup *et al.*, 2008).

L'elevatissima percentuale di ceppi resistenti nei confronti dei fluorochinoloni è nettamente superiore a quella riportata in altri studi svolti in Italia (Pezzotti *et al.*, 2003; EFSA, 2007b; Parisi *et al.*, 2007) e può essere correlata al notevole impiego di questa classe di antibiotici in avicoltura. È, infatti, nota la relazione temporale tra lo sviluppo di resistenza ai fluorochinoloni da parte di *Campylobacter* spp., con *trend* in aumento, e la loro introduzione nella terapia degli animali destinati alla produzione di derrate per l'uomo (EFSA, 2009). Questa evidenza è ulteriormente avvalorata dal fatto che nei Paesi nei quali non è permessa la somministrazione di fluorochinoloni agli animali destinati al consumo umano, la percentuale di ceppi di *Campylobacter* resistenti a questi principi attivi è molto esigua (EFSA, 2005, Han *et al.*, 2009). A tale proposito appare significativo come tutti i ceppi siano risultati sensibili al cloramfenicolo, la cui somministrazione agli animali da macello è vietata in Europa dal 1994 (Regolamento CEE n.1430/94). Un altro riscontro interessante è la sensibilità della maggior parte dei ceppi nei confronti degli aminoglicosidi, il cui uso è molto limitato sia in avicoltura, sia nella terapia umana delle infezioni da *Campylobacter* spp.

Anche la resistenza osservata nei confronti dei macrolidi è notevolmente superiore

a quella riportata negli altri studi italiani (Pezzotti *et al.*, 2003; EFSA, 2007b; Parisi *et al.*, 2007), mentre la maggior percentuale di ceppi resistenti tra gli isolati di *C. coli*, rispetto a quelli di *C. jejuni*, conferma la maggiore tendenza della prima specie ad acquisire resistenza nei confronti dei macrolidi rispetto alla seconda, come già frequentemente riportato (EFSA, 2009). La sensibilità dei ceppi alla clindamicina corrisponde a quella nei confronti dei macrolidi e si può spiegare con la frequente cross-resistenza che i batteri instaurano nei confronti di queste due classi di antibiotici.

La resistenza nei confronti dell'ampicillina e delle cefalosporine, mostrata da un'elevatissima percentuale degli isolati, non è invece un riscontro anomalo, in quanto è noto che la maggior parte dei ceppi di *C. coli* e di *C. jejuni* è dotata di meccanismi che conferiscono loro resistenza alle beta-lattamine, le quali, proprio per questo motivo, vengono utilizzate come supplementi selettivi ai terreni per l'isolamento di *Campylobacter* spp. (Aarestrup *et al.*, 2008). È, altresì, nota una moderata sensibilità nei confronti del cefotaxime (Aarestrup *et al.*, 2008), in sintonia con quanto rilevato in questa indagine. Il diverso profilo di sensibilità tra *C. coli* e *C. jejuni* nei confronti di ossitetraciclina e streptomina risulta invece di difficile interpretazione sulla base delle conoscenze attuali.

Un'ultima osservazione riguarda la sensibilità nei confronti dell'acido nalidixico, la cui valutazione rientra tra i test per l'identificazione di specie dei *Campylobacter* termofili previsti dalla norma ISO 10272-1:2006, sulla base del fatto che solo alcuni ceppi di *C. lari* sarebbero resistenti all'acido nalidixico, mentre le altre tre specie termofile sarebbero sensibili. Dai risultati ottenuti nella presente indagine (resistenza del 95% degli isolati di *C. coli* e del 94% dei ceppi di *C. jejuni*) questo test sembra essere inefficace ai fini dell'identificazione di specie.

Conclusioni

Questo studio rappresenta uno dei pochi in cui è stato indagato il profilo di antibiotico-resistenza di *C. jejuni* e di *C. coli* isolati da polli da carne in Nord Italia ed ha rivelato un'elevata prevalenza di multi-resistenza agli agenti antimicrobici testati. Si tratta di un'evidenza piuttosto preoccupante, in quanto tali microrganismi, provenienti da animali destinati al consumo umano, potrebbero essere trasmessi per via alimentare all'uomo, come già segnalato dall'*European Food Safety Authority* (2008). Questo riscontro è aggravato dal fatto che la gran parte dei ceppi analizzati è risultata resistente agli antibiotici di prima scelta nella terapia della campilobatteriosi umana. L'infezione umana da parte di questi microrganismi sarebbe quindi complicata dall'impossibilità di contrastarla con le terapie d'elezione, favorendo così l'insorgenza di forme sistemiche.

Nonostante i notevoli sforzi fatti, sembra ancora molto difficile riuscire a contenere l'infezione da *Campylobacter* termofili negli avicoli (Newell *et al.*, 2010), per cui, sulla scorta delle osservazioni effettuate, risulta molto importante monitorare la resistenza di microrganismi così significativi dal punto di vista della Sanità Pubblica, per poterne valutare il *trend* e quindi sviluppare ed attuare delle strategie di controllo. Tra queste, la principale è l'uso razionale degli antimicrobici in zootecnia, e in particolare in avicoltura, in quanto la loro somministrazione agli animali destinati al consumo umano è uno dei principali fattori responsabili della selezione di batteri zoonosici antibiotico-resistenti trasmissibili all'uomo.

Bibliografia

1. AAVV. (2008). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *OIE Terrestrial Manual*, Chapter 2.9.3., pp. 1185-1191.
2. Aarestrup FM, McDermott PF and HC Wegener. (2008). Transmission of antibiotic resistance from animals to humans. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ (Eds.), *Campylobacter*, ASM Press, Washington, DC, pp. 645-665.
3. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris LC and M Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Techn. Bull. Regist. Med. Technol.* 36: 493-496.
4. CLSI (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S17.
5. EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Campylobacter* in animals and foodstuffs. *The EFSA Journal.* 173: 1-10.
6. EFSA (2007a). Report including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. *The EFSA Journal.* 96: 1-46.
7. EFSA (2007b). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs - including information on foodborne outbreaks, antimicrobial resistance in zoonotic agents and some pathogenic microbiological agents – in 2007. Italy.
8. EFSA (2008). Joint Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal.* 765: 1-87.
9. EFSA (2009). Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. Scientific Opinion of the European Centre for Disease Prevention and Control; Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards; Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use; Scientific Opinion of the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. *The EFSA Journal.* 7 (11): 1372.
10. EFSA (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal.* 1496.
11. EN ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: detection method.
12. Han F, Lestari SI, Pu S and B Ge. (2009). Prevalence and antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. in Louisiana retail chickens after the enrofloxacin ban. *Foodborne Pathog. Dis.* 6 (2): 163-71.
13. Newell DG and JA Wagenaar. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. In: Nachamkin I, Blaser MJ (Eds.), *Campylobacter*, ASM Press, Washington, DC, pp. 497-509.
14. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, der Giessen JV and H. Kruse. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* In press
15. Parisi A, Lanzillotta SG, Addante N., Normanno G, Di Modugno G, Dambrosio A and CO Montagna. (2007). Prevalence, Molecular Characterization and

- Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* Isolates from Cattle, Hens, Broilers and Broiler Meat in South-eastern Italy. *Vet. Res. Comm.* 31: 113-123
16. Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M and R Perin. (2003). Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int. J. Food. Microbiol.* 82: 281-287.
 17. Regolamento (CE) n. 1430/94 della commissione del 22 giugno 1994 che modifica gli allegati I, II, III e IV del regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio che definisce la procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. GU L 156 del 23.6.1994, pagg. 6-8.
 18. Sahin O, Morishita TY and Q Zhang. (2002). *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Anim. Health Res. Rev.* 3 (2): 95-105.
 19. Steele TW and SN McDermott. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology.* 16: 263-5.
 20. van Hees BC, Veldman-Ariesen MJ, de Jongh BM, Tersmette M and W van Pelt. (2007). Regional and seasonal differences in incidence and antibiotic resistance of *Campylobacter* from a nationwide surveillance study in The Netherlands: an overview of 2000-2004. *Clin Microbiol Infect.* 13 (3): 305-10.
 21. Wingstrand A., Neimann J., Engberg J, Nielsen EM., Gerner-Smidt P., Wegener HC and K Molbak. (2006). Fresh chicken as mail risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 280-5.
 22. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N and T Tsukamoto. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 56 (11): 1467-73.

Tabella 1. Risultati della ricerca di *Campylobacter* termofili nei gruppi positivi.

Gruppo	Età animali	% campioni positivi	% isolati di <i>C. jejuni</i>	% di isolati di <i>C. coli</i>
Brescia	30 gg	10%	0%	100%
Cremona	37 gg	100%	95,2%	4,8%
Verona 1-1*	51 gg	65%	15,4%	84,6%
Verona 1-2*	42 gg	65%	69,2%	30,8%
Verona 4-1*	22 gg	50%	83,3%	16,7%
Verona 4-2*	22 gg	40%	100%	0%
Verona 4-3*	26 gg	50%	40%	60%

* Allevamento - Gruppo

Tabella 2. Risultati dei test di sensibilità agli antibiotici.

Classe	Principio attivo	Sensibile N° isolati (%)	Intermedio N° isolati (%)	Resistente N° isolati (%)
Aminoglicosidi	Apramicina	57 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	Gentamicina	55 (96%)	0 (0%)	2 (4%)
	Streptomicina	47 (82%)	0 (0%)	10 (18%)
Cefalosporine	Cefalotina	0 (0%)	0 (0%)	57 (100%)
	Cefotaxime	35 (61%)	15 (26%)	7 (12%)
	Ceftiofur	0 (0%)	2 (4%)	55 (96%)
	Cefuroxime	0 (0%)	0 (0%)	57 (100%)
Penicilline	Ampicillina	2 (4%)	0 (0%)	55 (96%)
	Amoxicillina+Acido Clavulanico	44 (77%)	9 (16%)	4 (7%)
Chinoloni	Acido nalidixico	3 (5%)	0 (0%)	54 (95%)
	Flumequina	0 (0%)	0 (0%)	57 (100%)
	Enrofloxacin	0 (0%)	14 (25%)	43 (75%)
	Ciprofloxacina	0 (0%)	0 (0%)	57 (100%)
Lincosamidi	Clindamicina	31 (54%)	1 (2%)	25 (44%)
Macrolidi	Eritromicina	31 (54%)	2 (4%)	24 (42%)
	Tilmicosina	33 (58%)	0 (0%)	24 (42%)
	Tilosina	32 (56%)	0 (0%)	25 (44%)
Sulfamidici + diaminopirimidine		10 (18%)	8 (14%)	39 (68%)
Tetracicline	Ossitetraciclina	17 (30%)	2 (4%)	38 (67%)
Fenicoli	Cloramfenicolo	57 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Figura 1. Rappresentazione grafica dell'esito degli antibiogrammi dei ceppi di *C. jejuni*.

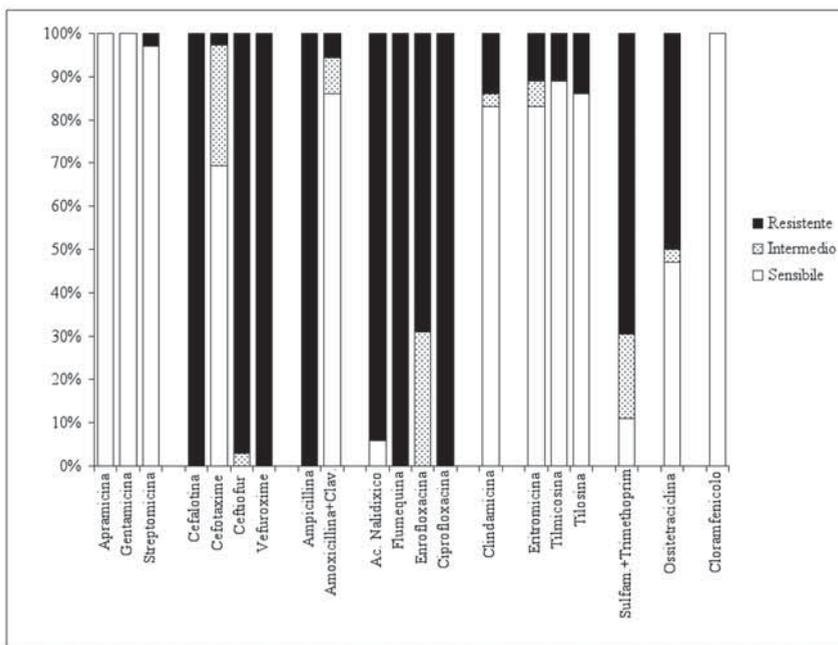
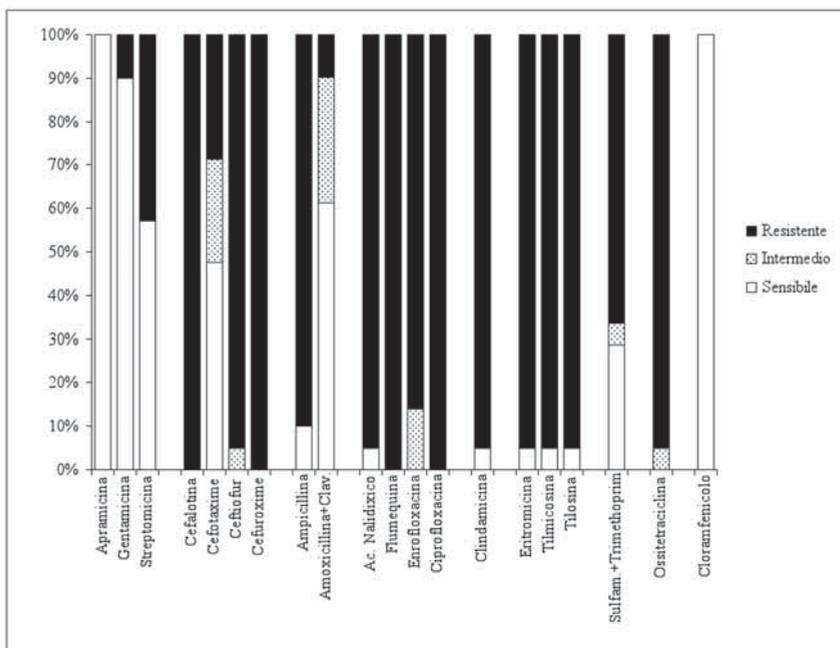


Figura 2. Rappresentazione grafica dell'esito degli antibiogrammi dei ceppi di *C. coli*.



IMPORTANZA DELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO NEI CASI DI ZOPPIA DEL POLLO E DEL TACCHINO

Giovanardi D.¹, Pesente P.¹, Rossi G.¹, Lupini C.², Morandini E.³, Catelli E.² e Ortali G.³

¹ *Laboratorio Tre Valli. San Michele Extra (VR), Italia*

² *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Veterinaria, Università di Bologna, Italia*

³ *Agricola Tre Valli. San Martino Buon Albergo (VR), Italia*

Riassunto

L'utilizzo degli strumenti di laboratorio, come descritto in questi tre casi clinici, è di fondamentale importanza per l'inquadramento diagnostico della zoppia nel pollo e nel tacchino.

Il primo caso clinico (A) si è presentato in un allevamento di polli da carne in cui, dall'età di due settimane, una percentuale elevata di soggetti esibiva zoppia monolaterale che non rispondeva a trattamento con vitamina D e calcio. Gli animali mostravano grave discondroplasia tibiale, osteomielite e fragilità ossea. Dalle analisi batteriologiche e biomolecolari si dimostrava che l'agente causale della osteomielite era *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. La sua scarsa sensibilità agli antibiotici ha reso difficile ma non impossibile il successo terapeutico con amoxicillina. È la prima segnalazione in Italia della presenza di questo batterio nel pollo.

Il secondo caso (B) ha coinvolto un allevamento di tacchini da carne maschi. Gli episodi di zoppia, iniziati alla decima settimana di età, costringevano gli animali a non deambulare correttamente diventando cachettici. Le lesioni comprendevano osteomielite nella testa del femore con artrite purulenta nella articolazione coxofemorale ed alla corrispondente tibiotarsometatarsale. L'isolamento ripetuto in sede di lesione di *Escherichia coli* sierotipo O78 confermava il suo elevato tropismo per le articolazioni ed il midollo osseo. Tutti gli *E. coli* O78 isolati sono APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) con una origine clonale diversa da quelli presenti negli organi setticemici. Trattamenti antibiotici mirati o di massa basati sull'antibiogramma sono stati in grado di prevenire nuovi casi o ridurre la gravità di quelli già esistenti.

Il terzo caso (C) è stato osservato in un allevamento di tacchini da carne maschi. Gli animali, dall'età di 80 giorni, hanno iniziato a presentare difficoltà di deambulazione. La lesione più comunemente evidenziata era una infiltrazione di essudato lattiginoso non purulento tra i fasci dei muscoli flessori delle dita e i tendini che poco interessava l'articolazione tibiotarsometatarsale. *Ornithobacterium rhinotracheale* è stato isolato con difficoltà dal liquido patologico di un tacchino ma la sua presenza, con PCR, dimostrata da più soggetti.

Introduzione

Gli episodi di zoppia negli allevamenti avicoli intensivi sono da ritenersi causa attuale ed importante dello scarso rendimento zootecnico degli animali. Le cause di tali eventi sono da ricondursi spesso a carenza di macro e microelementi

tra cui calcio, fosforo, manganese e di vitamina D oppure ad infezioni virali da reovirus. L'eziologia batterica di questa manifestazione clinica è da tempo dimostrata, infatti numerosi microrganismi sono stati isolati in sede di lesione tra cui: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus cecorum*, *Riemerella anatipestifer* e *Mycoplasma synoviae* (1,4,9). *Streptococcus gallolyticum*, precedentemente classificato come *Streptococcus bovis* tipo 1, è considerato essere un commensale della flora batterica intestinale. Esistono alcune segnalazioni di focolai di setticemia nel pollo anche in presenza di artrite e osteomielite (3,8).

Materiale e Metodi

Allevamenti. L'allevamento di polli da carne (A) era costituito da numero di animali 16400 maschi e 5800 femmine. I conferimenti di animali zoppicanti presso il Laboratorio sono stati due: alla terza e sesta settimana di vita.

L'allevamento di tacchini (B) era costituito da 4500 soggetti maschi che, precedentemente ai casi di zoppia, iniziati intorno alla 10° settimana, avevano conosciuto qualche lieve episodio di colissetticemia. Sono stati analizzati soggetti della 12° e 13° settimana di vita.

Nell'altro allevamento di tacchini (C) erano presenti circa 28000 maschi che, come nel caso precedente, avevano presentato sintomi clinici e lesioni di colissetticemia alla 10° settimana. Successivamente, alla 12° settimana, su una percentuale elevata di soggetti, si evidenziava zoppia con scadimento generale degli animali. Alcuni di essi sono stati inviati al Laboratorio.

Iter diagnostico comune. L'iter di indagine diagnostico, per tutti i casi clinici, ha compreso la ricerca batteriologica dalle articolazioni colpite, dal midollo osseo, dalla testa del femore e dai visceri interessati da lesione nei casi di setticemia. A tale scopo, tamponi od organi sono stati inoculati su agar sangue (5 % sangue di montone) e su Eosin Methylene Blue agar (E.M.B.) (OXOID, Basingstoke, UK) ed incubati a 37 °C per 24 - 48 ore in aerobiosi. La crescita batterica sui terreni è stata valutata e successivamente i batteri sono stati tipizzati e la valutati per la loro antibiotico-sensibilità con il metodo Kirby-Bauer (colistina, gentamicina, apramicina, amoxicillina, ampicillina, aminosidina, trimethoprim e sulfamidico, enrofloxacin e ossitettraciclina).

Iter diagnostico caso clinico A. Il ceppo batterico, riferibile a *Streptococcus*, è stato sottoposto a tipizzazione biochimica con Rapid ID 32 STREP (Biomèrieux, Francia) e a sequenziamento del 16 S e 23 S DNA ribosomiale.

Iter diagnostico caso clinico B. I diversi ceppi di *Escherichia coli* (*E. coli*) sono stati tipizzati biochimicamente con Microbact GN12/A (OXOID) e sierologicamente con antisieri O1, O2, O78 (VLA, Weybrige, UK). Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca dei geni di virulenza *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh*, *papC* mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) e analizzati per similarità genomica utilizzando la tecnica RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) comparandoli anche ad altri ceppi di *E. coli* isolati precedentemente in corso di setticemia (5,6,7). Tamponi tracheali, cloacali e milze di tacchini, prelevati settimanalmente, sono stati sottoposti ad analisi PCR per la ricerca del Metapneumovirus Aviare e del virus della Enterite Emorragica (dati non mostrati) (2).

Iter diagnostico caso clinico C. Il ceppo batterico riferibile a *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) è stato sottoposto a tipizzazione biochimica con API NE (Biomèrieux). I tamponi articolari, dopo semina sui terreni di coltura, sono stati analizzati con PCR specifica per ORT (10).

Risultati e discussione

Caso clinico A

In entrambi i conferimenti, le lesioni osservate costantemente sono state: discondroplasia tibiale, osteomielite nella epifisi delle ossa lunghe (femore, tibia) e fragilità ossea. Dal primo conferimento di polli è stato isolato in purezza *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* dal midollo osseo. Il batterio era Gram positivo, esulina positivo su Bile Aesculin Azide agar (OXOID), catalasi negativo, ossidasi negativo e con profilo biochimico 20273061110 con RapidID STREP corrispondente a *Streptococcus bovis* I (il database di questa galleria non prevede l'identificazione di *S. gallolyticus*). Il sequenziamento del 16S (99% di omologia per *S. gallolyticus*) e del 23S (98% di omologia per *S. gallolyticus*) tipizzava in modo definitivo il batterio come *Streptococcus gallolyticus*. Questo microrganismo risultava sensibile ad Ampicillina ed Amoxicillina.

Dalla bibliografia si evince che il primo focolaio di infezione, documentato nel pollo da carne in Belgio (3), ha causato, a differenza di questo episodio, non solo osteomielite ma anche artrite e lesioni setticemiche con epatosplenomegalia e focolai necrotici multifocali diffusi. In un secondo caso in Giappone (8), molto simile al primo per le lesioni setticemiche, non sono però state osservate artrite ed osteomielite. Questi ultimi autori ipotizzano che *S. gallolyticus* sia un batterio opportunista molto diffuso nelle feci di polli sani e che, solo occasionalmente, in condizioni di stress e/o di altre malattie intercorrenti, possa dare luogo a localizzazioni setticemiche. In alternativa, essi speculano che solamente alcuni cloni virulenti siano in grado di determinare malattia (8).

Caso clinico B

Nella maggior parte dei tacchini conferiti al laboratorio si evidenziava distacco della cartilagine della testa del femore con essudato purulento nell'articolazione coxofemorale come pure in quella corrispondente tibiotarsometarsale (senza lesioni setticemiche). In tre soli animali, le lesioni precedenti erano accompagnate da pericardite e aerosacculite fibrinosa.

Sono stati isolati sette *E. coli* O78: uno dalla testa del femore, tre dalla articolazione coxofemorale e tre dalla tibiotarsometarsale corrispondente (nessun isolato da altri distretti). I batteri erano non emolitici, lattosio positivi, ossidasi negativi, catalasi positivi e con profilo biochimico riferibile a *E. coli* con Microbact GN/12A. Sei ceppi isolati erano sensibili a: colistina, gentamicina, apramicina, aminosidina ed enrofloxacin. Un solo ceppo evidenziava sensibilità anche per trimetoprim-sulfamidico. La presenza in allevamento di questi due antibioticotipi si era già osservata analizzando i visceri (polmone, cervello) a seguito di precedenti episodi di colisettemia. Questi ultimi erano caratterizzati da lesioni riferibili ad artrite, pericardite, aerosacculite e raramente polmonite fibrinosa. Il più grave episodio di colibacilloso con mortalità del 0,5% in pochi giorni si osservava tra la 11 e la 12 settimana di vita preceduto da una duplice infezione virale da parte di Avian Metapneumovirus e del virus della Enterite

Emorragica.

Tutti i 7 *E.coli* O78 erano da considerarsi APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) in quanto positivi per i geni di virulenza *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh*.. Dalla analisi RAPD, 6 isolati su 7 non mostravano similarità genomica con 8 ceppi di *E. coli* O78 isolati da visceri (cervello, polmone, pericardio) di animali colpiti da colisetticemia nelle settimane precedenti. Sulla base di questi dati, si ipotizza che i ceppi di *E. coli* O78 a tropismo articolare avevano una diversa origine clonale rispetto ai setticemici.

Caso clinico C

Tutti i tacchini conferiti presentavano solamente lesioni localizzate bilateralmente tra i fasci dei muscoli flessori delle dita e i tendini (con scarso interessamento dell'articolazione tibiotarsometatarsale). A questo livello era presente un essudato lattiginoso non purulento e privo di fibrina. Dopo 72 ore di incubazione a 37 °C in agar sangue, ORT era isolato con difficoltà da un animale. Molto probabilmente la vitalità del batterio era molto scarsa in sede di lesione. Il batterio isolato era Gram negativo, ossidasi positivo, pleomorfo con profilo biochimico 022004 con API NE. L'indagine con PCR ha permesso di rilevare la presenza di ORT dall'essudato muscolo tendineo di altri due soggetti. Il batterio risultava sensibile ad Ampicillina e Amoxicillina.

Conclusioni

In questo lavoro, è stata diagnosticata una eziologia batterica in tutti e tre i casi clinici di zoppia. *Streptococcus gallolyticus* è da ritenersi patogeno nuovo ma, vista la scarsa casistica, non ancora "emergente" nei nostri allevamenti italiani. *E. coli* e ORT, presenti da anni negli allevamenti di polli e tacchini, si sono confermati comuni agenti eziologici nei casi di zoppia. Si sottolinea l'importanza di una accurata diagnosi dei casi clinici di zoppia, indispensabile per approntare il corretto trattamento terapeutico in allevamento sulla base dell'antibiogramma. A supporto della classica analisi microbiologica è sempre più importante, ove possibile, abbinare tecniche di biologia molecolare per diversi motivi: la tipizzazione del ceppo batterico (es. *S. gallolyticus*), la determinazione del suo patotipo (es. APEC) e la identificazione di batteri di difficile isolamento sui terreni di coltura (es. ORT).

Ringraziamenti

Per il prezioso lavoro tecnico eseguito, gli autori ringraziano i Sig.ri C. Margonari, S. Polinari e S. Trentin

Bibliografia

1. Barnes, J. H., Nolan, L. K., Vaillancourt JP. Colibacillosis. In Diseases of Poultry, 12th ed. Blackwell Publishing, Ames. pag. 691-737. 2008.
2. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. Avian Pathology, 28:593-605. 1999.
3. Chadfield M.S., Christiensen J.P., Decostere A., Christiensen H., Bisgaard M. Geno- and Phenotypic Diversity of Avian Isolates of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis*) and Associated Diagnostic Problems.

- Journal of Clinical Microbiology. Mar. 822-827. 2007
4. Chin R.P., Paul Van Empel, H. M. Hafez, *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In Diseases of Poultry, 12th ed. Blackwell Publishing, Ames. pag 765-774. 2008.
 5. Gophna U., Oelchlaeger T.A., Hacker J., Ron, E.Z. *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. FEMS Microbiology Letters. 196: 57-60. 2001.
 6. JanBen T., C. Schwarz, P. Preikshat, M. Voss, P. Hans-C, and L. Wiewer. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. Int.J.Med.Microbiol., 291: 371-378. 2001.
 7. Maurer, J. J., M.D. Lee, C. Lobsinger, T. Brown, M. Maier, and S. G. Thayer. Molecular Typing of Avian *Escherichia coli* Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA. Avian Diseases, 42, 431-451. 1998.
 8. Sekizaky T., Nishiya H., Nakajima S., Nishizono M., Kawano M., Okura M., Takamatsu D., Nishino H., Ishiji, Osawa R. Endocarditis in Chickens Caused by Subclinical Infection of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Avian Diseases 52:183-186, 2008
 9. Van Empel P. *Ornithobacterium rhinotracheale*. In Poultry Diseases 6th Elsevier Limited. pag. 164-169. 2008
 10. Van Empel, P., Hafez, H.M., *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. Avian Pathology 28: 217-227, 1999.

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

TECNOLOGIA BIOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DI POLLINA DI OVAIOLE (BREV. EUROPEO EP 1314710 A1): PROGETTO MIDA (MANURE HYGIENIZATION DEVELOPMENT AND APPLICATION) SANITIZZAZIONE

Golfari G.¹, Dall'Ara A.², Massi P.³, Poglayen G.⁴

1. *Veterinario libero professionista (ex borsista SPINNER)*

2. *ENEA, UTTMF, Unità Tecnica Tecnologie dei Materiali Faenza*

3. *IZSLER - Sezione di Forlì*

4. *Università di Bologna, Dip. di Sanità Pubblica Veterinaria*

Abstract

L'obiettivo è quello di superare la gestione della pollina come rifiuto e la necessità di terreni agricoli per il suo spandimento, attraverso la produzione diretta di fertilizzante di qualità, igienico, in grado di migliorare la struttura del terreno e la sua fertilità, oltre a recuperare il suolo dalla predesertificazione.

In dettaglio, l'obiettivo del progetto era quello di verificare l'igienizzazione della pollina di gallina ovaiole tramite bio-trattamento, ai sensi delle indicazioni contenute nel Reg. (CE) 1774/2002. Il prodotto ottenuto non è un rifiuto, ma un fertilizzante organico igienico, sicuro e commerciabile.

La pollina, essiccata a tre diversi livelli di umidità tramite MDS (Manure Drying System), è stata trattata all'interno di big-bags e in cumulo, con l'aggiunta di PAV (principi attivi vegetali) biocatalizzatori di origine vegetale, in un allevamento avicolo del nostro Paese.

Il campionamento e le analisi sulla pollina, prelevata a -3 (prima dell'ingresso nel MDS), 0, 38, 81, 123 giorni, sono stati condotti seguendo il Reg. (CE) 1774/2002 che prevede durante il processo:

- la riduzione di 5 unità log 10 di *Enterococcus faecalis*;
- la riduzione di 3 unità log 10 di *Parvovirus*.

Sono inoltre richieste nel prodotto finito e nell'immagazzinamento rispettivamente:

- concentrazione di *Escherichia coli* inferiore o uguale a 1.000 ufc/g;
- assenza di *Salmonella* spp.

In questa fase iniziale, a causa della elevata resistenza ambientale degli elementi di dispersione dei parassiti, abbiamo aggiunto anche la valutazione dell'attività dei PAV sulle oocisti dei coccidi e sulle uova di ascaridi. Questo ha giustificato il prelievo di campioni al giorno -3 utile per valutare la carica parassitaria della pollina all'atto della emissione. Contemporaneamente sono stati ricercati anche miceti patogeni e saprofiti. Per l'assenza di malattie da *Parvovirus* nel pollame, allo scopo di ottemperare al reg. (CE) 1774/2002, abbiamo sviluppato una prova "figlia" in condizioni controllate, aggiungendo *Parvovirus* di origine suina nella pollina.

In generale, l'attività sperimentale di MIDA ha dato buoni risultati nella riduzione dei parametri biologici dopo 123 giorni, dati che incoraggiano gli autori a perseverare nello sviluppo del progetto ed anche nella ricerca di un sostegno finanziario.

Overall, the goal is to overcome the management of manure as waste and the agricultural lands need for its spreading through the direct production of quality

hygienic fertilizer, that improves the soil structure, enhances its fertility and rehabilitates for predesertification.

In details, the aim of the project was to verify laying hen manure (LHM) hygienisation by bio-treatment, according to Reg. (CE) 1774/2002 indications. The obtained product, should be transformed not in a waste, but in an hygienic and marketable safe organic fertilizer.

LHM dried at three different level of humidity by MDS (Manure Drying System) was treated inside big-bags and pile, by adding PAV (Vegetal Active Principles) a biocatalyst of plant origin, in a poultry farm in Italy.

Manure sampling and analysis, taken at days -3 (before MDS), 0, 38, 81, 123, were carried out following Reg. (CE) 1774/2002 and taking into account also the chemical nutrients considered in D. Lgs. 217/06. Objectives for thermal and chemical process are:

- absence of *Salmonella* spp. in 25 grams;
- concentration of *Escherichia coli* in 1 gram lower than or equal to 1000 u.f.c.;
- reduction 5 log 10 of *Enterococcus faecalis* in 1 gram;
- reduction 3 log 10 of *Parvovirus*.

In this early stage, due to the high environmental resistance of dispersal stages of parasites, we have added also the evaluation of PAV's activity on coccidia and ascarid eggs. This justified the sampling at day -3 useful to assess the parasites burden in the fresh LHM.

Also pathogen and saprophytic fungi were searched with the same timing.

Due to the absence of *Parvovirus* in poultry, to follow the reg. (CE) 1774/2002 we have developed a “daughter” trial in controlled conditions adding *Parvovirus* of swine origin to LHM.

From a general point of view, the experimental activity of MIDA has shown good results in reducing biological parameters after 123 days and appears to be encouraging for the authors to go on, developing the project and searching for financial support.

Premessa Contesto applicativo

MIDA (Manure hygienisation Development and Application) è un progetto di ingegnerizzazione di un processo di igienizzazione delle deiezioni (tecnicamente definite pollina) delle galline ovaiole, attraverso l'applicazione di nuove tecnologie biologiche (bio-trattamento). L'obiettivo generale del progetto mira a superare la gestione della pollina come sottoprodotto e la necessità di disporre di suolo agricolo per la sua distribuzione, attraverso la produzione diretta di un fertilizzante di qualità con la capacità di migliorare la struttura dei terreni per una loro maggiore fertilità e un recupero della predesertificazione. Obiettivo specifico della sperimentazione è la verifica dell'igienizzazione della pollina di galline ovaiole essiccata tramite MDS (Manure Drying System), rispettando le indicazioni contenute nel reg. CE 1774/2002 s.m.i. In termini pratici si richiede durante il processo (Allegato VIII, cap. III):

- la riduzione di 5 unità log 10 di *Enterococcus faecalis*;
- la riduzione di 3 unità log 10 di *Parvovirus*.

Sono inoltre richieste nel prodotto finito e nell'immagazzinamento

rispettivamente:

- concentrazione di *Escherichia coli* inferiore o uguale a 1.000 ufc/g;
- assenza di *Salmonella spp.*

Il prodotto ottenuto, tenendo conto anche dei nutrienti chimici considerati nel D. Lgs. 217/06, non è più un sottoprodotto, ma un fertilizzante organico igienico e sicuro che può essere immesso sul mercato.

MIDA è ispirato dalla necessità di risolvere:

- 1) il costoso smaltimento della pollina in eccesso;
- 2) l'inquinamento ambientale correlato alla pollina;
- 3) la mineralizzazione troppo veloce dell' azoto;
- 4) il divieto di commercializzazione della pollina come fertilizzante a meno che non sia sottoposta ad adeguato processo igienizzante, conformemente alla normativa vigente reg. CE 1774/2002 e s. m. i., che prevede il mantenimento del materiale a 70 °C per almeno un'ora.

1) La legislazione europea e la normativa italiana (direttiva nitrati CEE/91/676 e PUA: Piano di Utilizzo Agronomico, D. Lgs. 152/99) prevedono l'individuazione preventiva di terreni convenzionati a disposizione e l'uso delle deiezioni animali con vincoli di distribuzione di 340 kg di azoto per ettaro, ridotti a 170 nei terreni vulnerabili. Il mancato rispetto di questi limiti può portare all'inquinamento delle falde acquifere sottostanti i terreni ed a problemi di asfissia nel suolo. Alcune province, come ad esempio quella di Forlì-Cesena, non hanno a disposizione suolo agricolo sufficiente per il numero di animali allevati, con il rischio di dover ridurre la produzione di pollame.

2) Un uso con spandimento improprio della pollina sul suolo può essere fonte di inquinamento, causando:

- a) contaminazione da nitrati delle acque sotterranee;
- b) emissioni in atmosfera di odori e di sostanze inquinanti, tra cui l'ammoniaca;
- c) eutrofizzazione delle acque di superficie dal deflusso di composti dell'azoto e del fosforo;
- d) inquinamento di acqua potabile da agenti patogeni.

3) Attualmente, in Italia, il concime è sparso sui campi, sui terreni agricoli ed interrato in pre-semina (in base alla legislazione citata). L'azoto (elemento fondamentale per lo sviluppo e la crescita delle piante) in essa contenuto, composto ureico, mineralizza in poche settimane; è prontamente disponibile per l'inquinamento ma non viene assorbito dalle piante, a meno che non siano caratterizzate da un ciclo di vita breve.

4) questo trattamento è costoso in termini di energia e difficile da attuare da parte degli agricoltori.

Il raggiungimento degli obiettivi del progetto MIDA può contribuire al superamento di problematiche ambientali quali:

A) l'esaurimento materia organica nel suolo a causa della produzione intensiva con l'utilizzo di fertilizzanti sintetici, che riduce la quantità di carbonio nel terreno, provoca la compattazione dei suoli (riduzione della porosità), e ne riduce la ritenzione idrica;

B) i cambiamenti climatici in corso che hanno effetto diretto sulle condizioni di

produzione agricola e sul suolo stesso; queste modifiche influenzano l'intensità e la distribuzione delle precipitazioni durante tutto l'anno (periodi caratterizzati da piogge intense e frequenti sono seguiti da periodi di siccità), stressando le colture, in particolare quelle ad alto fabbisogno idrico (mais, frutta, verdura), aumentando il rischio di erosione e frane.

Protocollo operativo

Materiali utilizzati

Con il progetto MIDA è stata testata una tecnologia italiana innovativa, sviluppata e brevettata da AMEK s. c. r. l. e CTI ("Processo di maturazione e stabilizzazione di biomassa per ridurre le emissioni maleodoranti", numero EP1314710). Il brevetto si riferisce a Principi Attivi Vegetali (PAV), un prodotto complesso, contenente una miscela di enzimi, biocatalizzatori preparati con piante o parti di esse. I PAV sono stati sviluppati con l'obiettivo primario di accelerare il processo di stabilizzazione aerobica della biomassa, e di conservare l'azoto in una forma a lento rilascio.

La miscela enzimatica è preparata utilizzando, come materie prime, piante appartenenti alle famiglie delle Cucurbitacee, Graminacee, Labiate, Ombrellifere e Rutacee oppure parti di esse in grado di sviluppare aromi. I vegetali vengono raccolti nel loro periodo balsamico e dopo l'eliminazione di parti danneggiate o non idonee, vengono sminuzzati fino a raggiungere le dimensioni di un chicco di riso. Segue la miscelazione con liquidi naturali fino ad ottenere una poltiglia semisolida (<http://ep.espacenet.com>). Per il prodotto vengono individuati anche i dosaggi di impiego variabili tra 0,1 e 2 kg/m³ di substrato da trattare.

Tipologia di pollina

E' stata impiegata la pollina essiccata tramite MDS (Manure Drying Sistem) proveniente da diversi capannoni di allevamento intensivo di galline ovaiole stabulate in gabbia (Petronelli, 2008). Gli animali erano tutti di razza Hyline brown, allevati in batteria, provenivano da pulcinaie sempre in batteria; erano stati vaccinati per malattia di Marek, pseudopeste aviare, bronchite infettiva, malattia di Gumboro, laringotracheite infettiva, vaiolo, corizza, *Salmonella* (ceppo *enteritidis*), encefalomielite, *Micoplasma gallisepticum*, sindrome del calo dell'ovodeposizione.

Tipologia di impianto

Si è previsto di testare sia la produzione di pollina direttamente in big bag, quindi la confezione già pronta per la commercializzazione finale, sia in cumulo presso le tettoie di stoccaggio presenti in allevamento. Lo schematizzazione del sistema di produzione del fertilizzante nel suo complesso è riportato in Figura 1.

La sperimentazione è stata condotta nel periodo novembre 2008 – aprile 2009.

Disegno sperimentale

Il progetto è stato sviluppato tramite l'applicazione del Design of Experiment (DOE). Si tratta di una metodologia statistica per la progettazione di un esperimento usata per descrivere un processo biologico complesso (Montgomery, 2005) . La DOE riduce il numero di esperimenti da effettuare in sistemi complessi caratterizzati da molte variabili che influenzano il processo. Il procedimento logico è riportato nella figura 2.

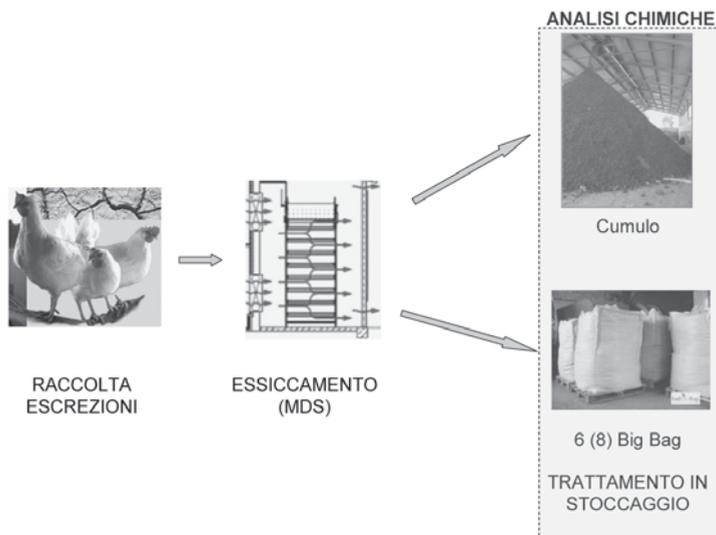


Figura 1. Schema a blocchi del processo di produzione del fertilizzante

La fase 1 (screening iniziale) è stata condotta su test e prove di trattamento eseguite negli anni precedenti presso lo stesso impianto ed ha permesso di individuare il grado di essiccamento iniziale della pollina (SS%) e il tempo di maturazione (t) quali fattori significativi¹ da usare come variabili di processo. È stata effettuata la fase 2 di approfondimento, per valutare gli effetti dei fattori significativi e le loro interazioni. Si è realizzato un esperimento fattoriale completo 2^k (*full factorial*), in cui k rappresenta il numero dei fattori (2), cioè 2^2 con 4 punti centrali (Petronelli, 2008).

Le analisi sono state pianificate a 38, 81, 123 giorni sulla pollina essiccata al 63%, 72%, 81%. I test sono stati eseguiti con trattamento della pollina all'interno di *big bags* (bioreattori) e in cumulo. Si è inoltre proceduto alla caratterizzazione della pollina all'uscita dell'MDS ($t = 0$) e si è deciso di effettuare prelievi anche a $t = -3$ g (prima dell'ingresso nel MDS) per caratterizzare il materiale appena escreto e valutare gli effetti dell'MDS su diversi agenti biologici.

Il **trattamento** è stato eseguito tramite additivazione di Principi Attivi Vegetali (PAV), in un'unica soluzione, nello strato inferiore dei *big bag* durante il loro allestimento, e sul cumulo in parecchi punti verso la fine della sua formazione, al tempo $t = 0$. I dosaggi di impiego sono stati di 1kg per big bag ($\geq 1m^3$).

Nel caso del trattamento in cumulo, la sua formazione ha richiesto 4 settimane, con un volume (stimato) di $480 m^3$; sono stati utilizzati 90 kg di PAV additivati durante la sua formazione.X

¹ Altri fattori quantitativi (variabili indipendenti) hanno influenza sul processo (ad es. temperatura del sistema, pH), ma non possono essere controllati, pertanto ci siamo limitati unicamente a misurarli. Ancora altri fattori di tipo qualitativo (presenza di tettoia/assenza di tettoia, sistema di gestione della pollina, tipo di impianto, estate/inverno, trattato con PAV/non trattato) che per motivi tecnici e logistici non sono stati considerati.

Campionamento

La procedura di campionamento si basa su istruzioni contenute nel regolamento (CE) 1774/2002 (allegato VIII, capitolo III), che indica la necessità di effettuare analisi su 5 campioni dello stesso tipo di materiale. Pertanto, al momento del campionamento, per ogni big bag e per il cumulo, sono stati prelevati 5 campioni per le analisi batteriologiche e virologiche e 5 campioni per l'analisi parassitologiche e micologiche. Si è scelto di aprire e vuotare completamente i sacconi per ogni prelievo. Per questo motivo sono stati allestiti nuovi big bag, 1 per ogni momento del campionamento. X Le analisi batteriologiche e virologiche sono state effettuate in giornata .

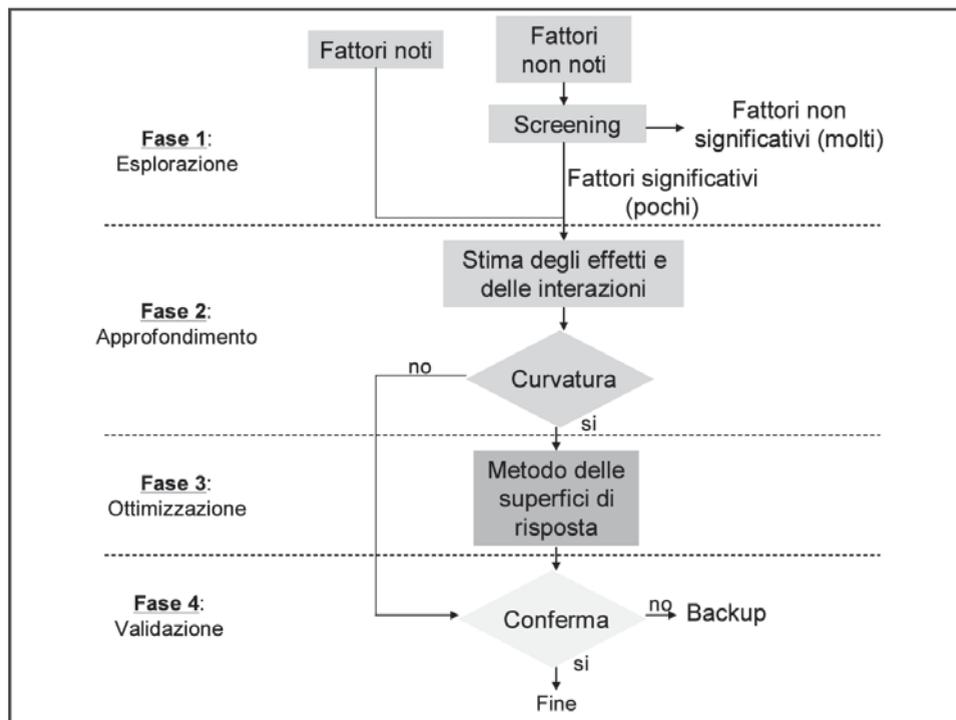


Figura 2. Schema del disegno sperimentale

Metodologie analitiche

In accordo con il Reg. (CE) 1774/2002, sono state effettuate **analisi** sui campioni di pollina per rilevare come la presenza di batteri (*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella* spp) e virus (*Parvovirus*) varia nel tempo. Sono stati ricercati anche funghi e protozoi (*Eimeria* spp.), per la notevole resistenza delle forme di dispersione nell'ambiente.

Le analisi, di tipo batteriologico, virologico, parassitologico e micologico, sono state condotte in base alle linee guida indicate nel regolamento 1774/2002, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinate al consumo umano, utilizzando le metodiche ISO 9000.

a) Esami batteriologici.

Gli esami batteriologici sono mirati alla individuazione di *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli*, in base alle metodiche descritte in “Manual of standards for diagnostic tests and vaccines” dell’ Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health).

Il metodo adoperato consente la numerazione degli Streptococchi (o Enterococchi) fecali formanti colonia e si sviluppa in 5 stadi successivi:

1. allestimento dell’omogenato;
2. allestimento delle diluizioni seriali decimali successive;
3. allestimento delle piastre;
4. incubazione;
5. lettura, conferma e numerazione delle colonie caratteristiche.

b) Esami virologici.

Gli esami virologici, mirati all’isolamento di parvovirus, sono stati condotti seguendo le metodiche descritte in “Manual of standards for diagnostic tests and vaccines” (Fourth edition, 2000). Sono state eseguite analisi al microscopio elettronico, utilizzando il metodo di colorazione negativa, noto anche come “metodo della goccia”.

c) Esami parassitologici.

Gli esami parassitologici sono stati volti ad isolare ed identificare le specie di coccidi eventualmente presenti e le uova di eventuali elminti. Sono stati realizzati esami copromicroscopici per concentrazione a mezzo centrifugazione e successiva levitazione in soluzioni ad alto peso specifico (1300 kg/m³), secondo “Manual of Veterinary Parasitology - Laboratory techniques” (MAFF/ADAS, 1986).

d) Esami micologici.

Per gli esami micologici i campioni, dopo l’allestimento ottenuto sospendendo 2 g di feci in 10 ml di soluzione fisiologica sterile antibiotata (50.000 U di Penicillina G Potassica e 50.000 U g di streptomina / 100 ml di soluzione fisiologica), sono stati lasciati in frigorifero per una notte. Per ogni campione si procedeva alla semina di 0,1 ml di sospensione, in doppio, su piastre di terreno ai semi di niger e creatinina (Shields e Ajello, 1966). Le piastre erano poi incubate a 26°C e 37°C per 10 giorni e controllate periodicamente. Le colonie di lieviti sviluppatasi venivano trapiantate su Sabouraud dextrose agar e incubate a 26°C per 2-3 giorni per essere quindi identificate, utilizzando primariamente gallerie API20C AUX (Biomérieux) e allestendo piastre di Dalmau su Yeast Morphology agar (DIFCO). Quando necessario, sono stati effettuati esami microscopici con tecnica di contrasto con inchiostro di china e test aggiuntivi di crescita e/o fermentazione.

Risultati e discussione

Caratterizzazione iniziale della pollina

La caratterizzazione biologica qualitativa della pollina appena escreta (t = -3) ha rilevato la presenza di *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, coccidi, miceti (*Candida albicans*, *Geotrichum klebahnii*, mucoracee) e l’assenza di *Salmonella* spp. e *Parvovirus*.

Enterococcus faecalis

I risultati delle determinazioni sono riportati in Tabella 1, per ogni sacco (o big bag) e per il cumulo (P- pile); l'anadamento della concentrazione media nei big bag è riportata in figura 2. Per quanto riguarda *Enterococcus faecalis*, la sua presenza è stata riscontrata in tutti i campioni.

La sua concentrazione iniziale, nella pollina all'uscita del MDS, si è mantenuta costante sia nella pollina essiccata utilizzata per allestire i sacconi a novembre che a dicembre, con un ordine di grandezza pari a 10^9 u.f.c./g. Nella pollina utilizzata a febbraio, la concentrazione è compresa tra 10^5 e 10^6 u.f.c./g. L'evoluzione nel tempo è riportata in Tabella 1; la sua riduzione, in unità logaritmiche è riportato nel grafico di Figura 2. *Enterococcus faecalis* si è ridotto di 6 unità logaritmiche dopo 123 gg. La riduzione di 5 unità logaritmiche in base 10, come previsto dalla normativa, è raggiunta nei big bag in soli 105 giorni (fig. 2).

Tabella 1 Andamento dell'*Enterococcus faecalis* nel corso della sperimentazione per singoli sacchi (big bag) e nel cumulo (P-pile)

% S.S. a t = 0	SACCO	B (t = 0)	C (t = 38)	D (t = 81)	E (t = 123)
63	11	$4,2 \times 10^9$			< 100
72	2	$8,5 \times 10^9$		$2,0 \times 10^5$	
72	3	$3,9 \times 10^9$		$4,0 \times 10^5$	
81	4	$8,4 \times 10^9$			$4,0 \times 10^2$
72	44	$4,0 \times 10^6$		$9,0 \times 10^3$	
72	5	$4,3 \times 10^9$		$5,0 \times 10^7$	
81	6	$2,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$		
72	7	$9,0 \times 10^9$			$3,0 \times 10^3$
63	77	$4,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$		
55	P	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	<100

CONSIDERAZIONI IN MERITO:

B→C: 77: ↓2 unità logaritmiche
6: =
P: =

B→D: 2: ↓ 4 unità logaritmiche
3: ↓ 4 unità logaritmiche
44: ↓ 3 unità logaritmiche
5: ↓ 2 unità logaritmiche
P: =

B→E: 11: ↓ 7-8 unità logaritmiche
4: ↓ 7 unità logaritmiche
7: ↓ 6 unità logaritmiche
P: ↓ 4-5 unità logaritmiche

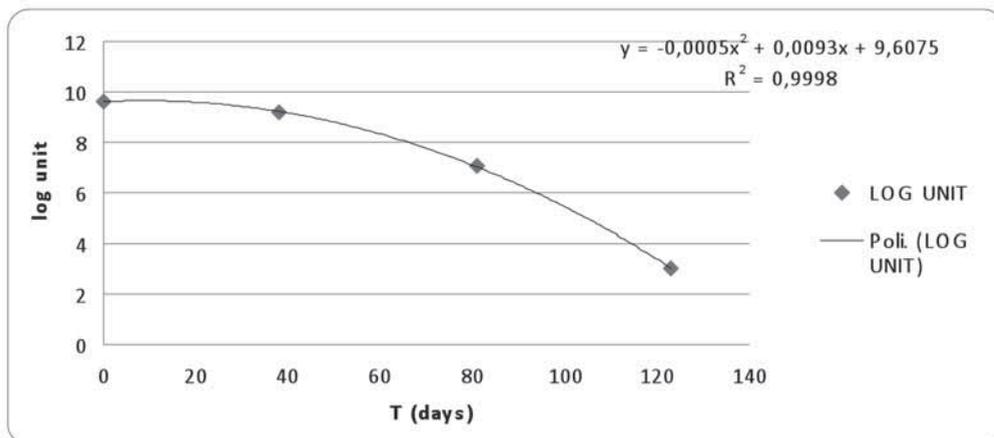


Figura 3. Andamento della concentrazione di *Enterococcus faecalis* nel tempo

Salmonella spp.

Questo patogeno, come atteso, era, assente nei campioni a $t = 0$, e la situazione si è mantenuta tale in tutti i prelievi successivi per entrambe le modalità operative (big bag e cumulo).

Escherichia coli

Presente in tutti i campioni per entrambe le modalità operative ha mostrato al termine del processo ($t = 123$) una concentrazione inferiore a 1000 u.f.c./g come richiesto dalla normativa.

Parvovirus

Non presente a partire da $t = 0$ e per tutti i campioni successivi. Per l'assenza di malattie da *Parvovirus* nel pollame, allo scopo di ottemperare al Reg. 1774/2002 abbiamo sviluppato una prova "figlia" in condizioni controllate, aggiungendo *Parvovirus* di origine suina nella pollina, patogeno risultato assente a fine processo, diminuito di 4 log 10 (la legge prevede un calo minimo di 3 unità).

Coccidi

I coccidi, presenti a $t = -3$ con una media di 808 OPG (range meno di 20-7180) hanno mantenuto la loro presenza lungo il processo dimostrando a $t = 123$ l'assenza di sporulazione e la contemporanea presenza di profonde alterazioni nella parete delle oocisti, indice di devitalizzazione.

Tabella 2. Andamento dei coccidi nel corso della sperimentazione nei sacchi (big bag) e nel cumulo (P-pile)

% S.S. a t = 0	SACCO	B (t = 0)	C (t = 38)	D (t = 81)	E (t = 123)
63	11	-----+			-----
72	2	+		---+ +-	
72	3	+		-	
81	4	+			+++++
72	44	--+ +-		-----	
72	5	+		+	
81	6	+++++	-----		
72	7	+			+++++
63	77	--+ +-	---+/-		
55	P	++++-	-----	-----	-----

Considerazioni

Dai risultati ottenuti è emersa sostanzialmente l'efficacia del trattamento con PAV della pollina nel trasformare il prodotto ottemperando le norme igieniche vigenti. I batteri, o hanno mantenuto la loro assenza (*Salmonella* spp.) oppure hanno ridotto la loro presenza anche oltre quanto previsto dalla legge. E' importante notare come il fenomeno si sia registrato sia nel cumulo sia nei big bag. Anche la sperimentazione "figlia" che siamo stati costretti a sviluppare con il parvovirus ha dimostrato di raggiungere l'obiettivo di eliminare questo patogeno dal materiale nei tempi previsti. Se vogliamo poi aggiungere un dato a nostro parere di estremo interesse, riteniamo importante l'osservazione relativa alla devitalizzazione delle oocisti dei coccidi che rappresentano forme di diffusione di questi protozoi fra le più resistenti in natura. L'attività dei PAV è quindi a largo spettro, abbracciando batteri, virus e protozoi e, come abbiamo potuto osservare, può essere ottimizzata da una riduzione della sostanza secca che ne abbrevia i tempi di efficacia dai 123 giorni previsti a 80. Il dato appare molto importante ma suggestivo di ulteriori approfondimenti la cui portata pratica potrebbe risultare in indubbi vantaggi economici.

Bibliografia

- MAFF/ADAS Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1986. "Manual of Veterinary Parasitology - Laboratory techniques" Reference Book 418, London, UK.
- Montgomery D.C., 2005. "Design and Analysis of Experiments" VI ed., John Wiley & Sons, New York
- Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health), anno. "Manual of standards for diagnostic tests and vaccines" Fourth edition, 2000.
- Petronelli, 2008. "Stabilizzazione e utilizzazione della pollina ai fini agronomici" Tesi di laurea Specialistica in Ingegneria Chimica. A.A. 2007/2008. Università di Bologna;
- Shields AB, Ajello L. (1966). "Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*". Science, 151:208-209.

DISCRIMINAZIONE RAPIDA FRA CEPPI VACCINALI E DI CAMPO DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* MEDIANTE TECNICA RFLP

Lupini C.¹, Cecchinato M.², Ricchizzi E.¹, Pesente P.³, Sperati Ruffoni L.³, Catelli E.¹

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Ozzano Emilia (BO)

² Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD)

³ Laboratorio TreValli, San Michele Extra (VR)

Introduzione

I *Metapneumovirus* Aviari (AMPV) sono virus ad RNA appartenenti alla famiglia delle *Paramyxoviridae* ed al genere *Metapneumovirus*. Sono causa nel tacchino di una infezione delle prime vie respiratorie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT), mentre nel pollo sono responsabili di forme respiratorie più o meno lievi, che possono sfociare nella Sindrome della Testa Gonfia. Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di AMPV (A, B, C e D), distinti variamente fra loro sia dal punto di vista genetico che biologico e sierologico. I sottotipi A e B sono i più diffusi a livello mondiale essendo presenti in Europa, Asia, Centro e Sud America ed inoltre in Africa, dove l'infezione è comparsa per la prima volta alla fine degli anni 70 (Gough e Jones, 2008).

In Italia l'infezione si è diffusa a partire dal 1987 (Fabris e D'Aprile, 1990). Successivamente si è endemizzata nelle Regioni a maggior vocazione avicola, con prevalenza del sottotipo B (Catelli *et al.*, 2004; Catelli, 2006). Per il controllo TRT sono utilizzati vaccini vivi attenuati; fra quelli disponibili nel nostro Paese è diffuso l'utilizzo del sottotipo B, somministrato nei tacchini da carne, via spray, in incubatoio. E' stato dimostrato che ceppi vaccinali possono essere evidenziati tramite RT-PCR fino alla quarta settimana di età (Catelli *et al.*, 2010), associati o meno a sintomatologia respiratoria. In presenza di forme cliniche risulta necessario poter discriminare tra ceppi di campo e di origine vaccinale.

L'analisi della sequenza del gene G di numerosi ceppi AMPV sottotipo B isolati in varie aree geografiche del mondo (Cecchinato *et al.*, 2009), ha rivelato la presenza, nella sola sequenza del vaccino B (ceppo VCO3) maggiormente utilizzato in Italia, di un sito di riconoscimento dall'enzima di restrizione *MseI*. Tale sito è localizzato nell'amplicone che si ottiene con il protocollo di RT nested-PCR messo a punto da Naylor *et al.* (1997), e comunemente impiegato in Europa per la diagnosi delle infezioni da AMPV e la distinzione fra sottotipi A e B.

Basandosi su queste evidenze, è stato messo a punto e testato su alcuni AMPV isolati in Italia, inclusi i ceppi precoci isolati da Catelli *et al.* (2010), un protocollo di PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in grado di discriminare fra ceppi sottotipo B di campo e vaccinali.

Materiali e metodi

1. Ceppi AMPV

Per validare il protocollo sono stati impiegati il ceppo vaccinale AMPV sottotipo B VCO3 e 10 ceppi di campo del medesimo sottotipo (isolati in Italia dal 1987 al 2009) di cui due presentavano sito di riconoscimento dell'enzima *MseI* (tabella 1).

2. PCR-RFLP

2.1. RT nested-PCR

L'RNA virale è stato estratto utilizzando un kit del commercio attenendosi alle istruzioni del produttore (QIAamp viral Mini Kit , Qiagen). La RT nested-PCR è stata eseguita secondo quanto descritto da Naylor *et al.* (1997) e Cavanagh *et al.* (1999). Il prodotto della amplificazione, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, è stato visualizzato mediante colorazione con Sybersafe™ DNA gel stainig (Invitrogen). In presenza di ceppi AMPV appartenenti al sottotipo B si ottiene un amplificato di 340 pb la cui specificità è stata valutata mediante *marker* di riferimento (Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen).

2.2. RFLP

L'enzima di restrizione *Mse*I (sito di riconoscimento 5'T¹TAA³) è stato utilizzato per digerire i prodotti ottenuti mediante RT nested-PCR. Il protocollo di restrizione, effettuato in un volume finale di reazione di 20 μ l, ha previsto la digestione a 65°C per 2 ore di 5 μ l di prodotto di amplificazione con 5 unità di enzima di restrizione. Dopo la digestione, i frammenti di DNA ottenuti sono stati separati in gel di agarosio e visualizzati come precedentemente descritto nel paragrafo 2.1. La presenza del residuo A in posizione 91 della sequenza nucleotidica del gene G del ceppo vaccinale, fa sì che il prodotto di RT nested-PCR venga tagliato dall'enzima in due frammenti di 300 e 40 pb ciascuno. L'avvenuta digestione enzimatica è stata verificata mediante confronto col prodotto di PCR non sottoposto a taglio enzimatico e marker di riferimento.

Risultati

Tutti i ceppi AMPV, sottoposti ad RT nested-PCR sottotipo A e B specifica, hanno prodotto un amplificato di 340 pb, caratteristico del sottotipo B. Al taglio enzimatico e successiva corsa elettroforetica, 8 ceppi hanno mostrato bande di dimensione invariate rispetto al prodotto di PCR; mentre il vaccino e 2 ceppi di campo (IT/Ty/129-08/04 ed IT/Ty/132-08/04) hanno prodotto una banda di 300 pb, indice dell'avvenuta digestione enzimatica (figura 1). Non è stato possibile evidenziare il secondo frammento (40 pb) atteso dal taglio enzimatico.

DISCUSSIONE

Questo lavoro riporta la messa a punto di un protocollo di PCR-RFLP che, testato su 10 isolati AMPV sottotipo B ed il vaccino del medesimo sottotipo, comunemente in uso in Italia, ha permesso di discriminare i ceppi di campo dal vaccino e dai ceppi IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04. Catelli *et al.* (2010), in un precedente lavoro, avevano dimostrato, mediante analisi filogenetica dei geni G ed F, una strettissima correlazione fra questi ultimi 2 ceppi ed il vaccino facendo supporre la loro origine vaccinale. Questo dato andrà confermato con futuri studi mediante paragone fra la sequenza completa dei ceppi in esame e del vaccino.

Il nostro protocollo di PCR-RFLP si basa su una RT nested-PCR specifica per i sottotipo A e B che è altamente sensibile (Cecchinato *et al.*, 2004) e già in uso in molti laboratori. Esso aggiunge a questa metodica la possibilità di discriminare, qualora venga evidenziata una positività per AMPV sottotipo B, l'origine dell'isolato. Altri autori hanno messo a punto metodiche di laboratorio in grado di identificare il ceppo AMPV vaccinale PL21 basandosi, alternativamente, su metodiche di PCR-

RFLP (Cavanagh *et al.*, 1999) o real-time PCR (Bouley *et al.*, 2009) disegnate su tratti del gene F. Questi protocolli, come anche quello riportato nel presente studio, si basano sulla presenza di una singola mutazione nucleotidica in un tratto specifico del genoma virale. Ciò rende necessario avere a disposizione informazione sui vaccini impiegati nell'area geografica di provenienza dei campioni diagnostici e verificare periodicamente l'evoluzione dei ceppi di campo in modo da non incorrere in false interpretazioni.

La metodica di PCR-RFLP messa a punto permette di discriminare i ceppi di origine vaccinale in maniera rapida ed economica e costituisce una valida alternativa al sequenziamento genico, che, sebbene fornisca informazioni più dettagliate, richiede attrezzature ancora non disponibili su larga scala, specie nei paesi in via di sviluppo, e costi più elevati.

Bibliografia

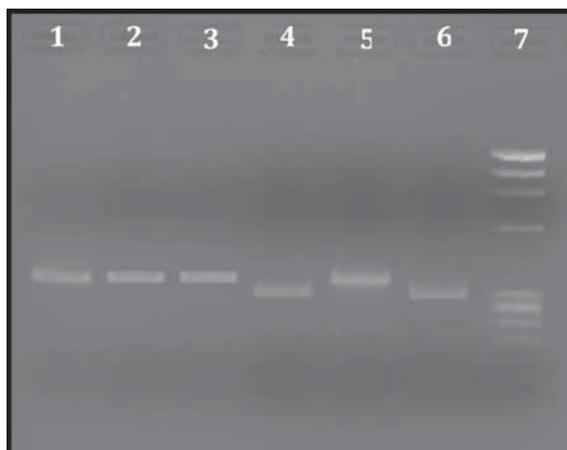
1. Bouley S., Sellal E., Bollart A., Lemiere S. (2009). *Differentiation of Avian Metapneumovirus (AMPV) subgroup B and live Avian Metapneumovirus homologous chicken vaccine using real-time RT-PCR*. 16Th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book. World Veterinary Poultry Congress, Marrakesh (Marocco) 8-12 Novembre 2009 p.281.
2. 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.
3. 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: 287-292.
4. Catelli E., Lupini C., Cecchinato M., Ricchizzi E., Brown P., CJ. Naylor. (2010) *Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity*. Vaccine. 28: 916–921.
5. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., CJ. Naylor. (1999) *Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions*. Avian Pathology. 28: 593-605.
6. Cecchinato M., Catelli E., Savage C., Jones RC, CJ. Naylor. (2004) *Design, validation, and absolute sensitivity of a novel test for the molecular detection of avian pneumovirus*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 16:582–585.
7. Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Clubbe J., C.J. Naylor. (2009). *Evidence of AMPV attachment protein evolution coincident with mass live vaccine introduction in Italy*. VI International Symposium on Avian Corona and Pneumovirus and Complicating Pathogens. Rauischholzhausen, Germany, 14-17 Giugno 2009. WB Lauferweiler Verlag, Giessen, Germany, 2009, pp.278-284.
8. Fabris G. e D'Aprile P.N. (1990) *Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio*. Zootecnica International. 6: 36-40.
9. Gough R.E., Jones R.C. (2008). *Avian Metapneumovirus*. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (Eds.), Diseases of Poultry, 12th Edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp. 100-110.
10. Naylor CJ., Shaw K., Britton P., Cavanagh D. (1997). *Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain*. Avian Pathology. 26: 327-338.

Tabella 1. Ceppi di AMPV sottotipo B sottoposti a PCR-RFLP.

Nome del ceppo	Anno di isolamento	Nucleotidi in posizione 88-91 nel gene G (5'-3')	Riferimento
IT/Ty/Vr240/87	1987	TTAG	Sperati Ruffoni L. (Lab. "Tre Valli")
IT/Ty/2a/01	2001	TTAG	Catelli <i>et al.</i> , 2004
IT/Ck/33°/02	2002	TTAG	Catelli <i>et al.</i> , 2004
IT/Ck/34°/02	2002	TTAG	Catelli <i>et al.</i> , 2004
IT/Ty/129-08/04*	2004	T [†] TAA	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ty/129-18/04	2004	TTAG	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ty/132-08/04*	2004	T [†] TAA	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ty/205-16/04	2004	TTAG	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ck/1348-01/07	2007	TTAG	Catelli E. (Università di Bologna)
IT/Ty/53/09	2009	TTAG	Catelli E. (Università di Bologna)
Ceppo vaccinale sottotipo B - VCO3*	-	T [†] TAA	-

* ceppi che alla PCR-RFLP che hanno subito taglio enzimatico

Figura 1. Elettroforesi in gel di agarosio di alcuni ceppi di AMPV sottotipo B sottoposti a PCR-RFLP.



Linea 1: IT/Ty/205-16/04, DNA prodotto della RT nested-PCR per AMPV;

Linea 2: IT/Ty/205-16/04, prodotto della RT nested-PCR sottoposto a digestione con *MseI*;

Linea 3: IT/Ty/129-08/04, DNA prodotto della RT nested-PCR per AMPV;

Linea 4: IT/Ty/129-08/04, prodotto della RT nested-PCR sottoposto a digestione con *MseI*;

Linea 5: Vaccino Ceppo VCO3; DNA prodotto della RT nested-PCR per AMPV;

Linea 6: Vaccino Ceppo VCO3; prodotto della RT nested-PCR sottoposto a digestione con *MseI*;

Linea 7: DNA Marker.

EPISODIO DI “FALSE OVAIOLE” IN GALLINE OVAIOLE DI 22 SETTIMANE DI ETÀ IN SEGUITO AD INFEZIONE DA VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE DENOMINATO QXLIKE

¹Massi P., ¹Fiorentini L., ¹Taddei R., ²Barbieri I., ¹Tosi G.

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

¹ *Sezione di Forlì*

² *Sede di Brescia*

Riassunto

Si descrive un episodio di “false ovaiole” in galline ovaiole di 22 settimane di età allevate in Romagna in seguito ad infezione da virus della Bronchite Infettiva aviare (IB) denominato “QXlike”. Trattasi di galline di razza Lohmann nate e allevate in Italia. All'età di 16 settimane il gruppo di galline aveva presentato una forma respiratoria da *Mycoplasma gallisepticum* con Colisetticemia. A 19 settimane veniva identificato un virus della BI sequenziato come QXlike. A 22 settimane la deposizione subiva un arresto sul 80%, contemporaneamente iniziavano a comparire soggetti non produttivi con lesioni dell'apparato riproduttore ascrivibili a “false layers”. Questo caso ha messo in evidenza la stretta correlazione fra virus della IB e la lesione morfologica e strutturale dell'apparato riproduttore.

Abstract

A case of “false layers” in 22 weeks commercial layers hens was described. The case was correlated with the presence of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV). At 16 weeks the animals manifested a respiratory syndrome by *M. Gallisepticum* and *E. Coli*. At 19 weeks of age a QXlike virus was identified. At 22 weeks the flock showed the “non-layers”.

Introduzione

La Bronchite Infettiva (IB) è una malattia ben nota, ma nel tempo si ripropone in forme diverse. Le cosiddette “false ovaiole”, già segnalate dagli anni '50 del secolo scorso e poi mai più viste grazie all'introduzione delle vaccinazioni in incubatoio, sono ricomparse negli ultimi anni in alcuni Paesi Europei.

Il fenomeno conosciuto come “false ovaiole” viene segnalato per la gravità delle lesioni osservate e soprattutto per l'elevata incidenza nei gruppi colpiti. Le galline affette rimangono improduttive. Salvo eccezioni, le false ovaiole morfologicamente sono indistinguibili da un normale soggetto in produzione. La patologia può manifestarsi sia in gruppi da riproduzione che in gruppi di ovaiole commerciali appartenenti a diverse linee genetiche. Anatomicamente l'ovaio è sviluppato e produttivo, ma l'ovidutto è danneggiato in modo tale da impedire il transito dell'ovulo e la formazione e deposizione dell'uovo completo. Si ritiene che il problema si generi in pollastri prive di anticorpi materni passivi omologhi (o cross-reattivi) in seguito ad un'infezione precoce di virus IB patogeno per l'apparato riproduttore (De Wit J.J., 2006). I soggetti colpiti presentano ovidutto cistico in cui si raccoglie abbondante quantità di liquido: da 0,5-1-1,5 litri di trasudato. In questi soggetti l'addome è teso e fluttuante e costringe l'animale

ad assumere un caratteristico aspetto definito a “pinguino”. Una delle ipotesi eziologiche più accreditata si basa su un’infezione precoce degli animali ad opera del ceppo “QX” della IB, descritto per la prima volta in Cina (Shengwang et al., 2004).

Dal 2005 (Beato et al., 2005) il virus della Bronchite Infettiva (IB) conosciuto come “QXlike” viene segnalato in Italia nel pollame sia da linea carne che da linea uovo. Fenomeni di “false ovaiole” nella galline commerciali (Bano et al., 2006) e da riproduzione (Massi, 2006) sono stati segnalati e diagnosticati. In nessun caso è stata dimostrata la correlazione, fra la presenza del virus QXIB e la lesione all’apparato riproduttore, ma solo ipotizzato per deduzione e affinità con quanto descritto in altri paesi europei (Landman et al., 2005).

Questo lavoro descrive un caso di “false ovaiole” in ovaiole commerciali nella sua forma iniziale correlato alla precedente identificazione del virus QXIB.

Materiali e metodi

Le osservazioni sono state raccolte in un gruppo di 36.000 ovaiole commerciali Lohmann brown, accasate all’età di 115 giorni e allevate in batteria. Le galline provenivano da una pulcinaia di circa 100.000 capi, poi, distribuite, all’accasamento, in tre allevamenti diversi. Il gruppo era stato regolarmente vaccinato nei confronti della Bronchite Infettiva secondo il seguente protocollo: 1°giorno con il ceppo vivo attenuato H120 spray, 10° giorno con il ceppo vivo attenuato 793B idro, 40° giorno con il ceppo inattivato contenuto nel vaccino trivalente (IB, ND e Corizza Infettiva) per via intramuscolare, 60° giorno con il ceppo vivo attenuato 793B idro, 95° giorno con il vaccino inattivato trivalente (IB, ND, Corizza Infettiva) per via intramuscolare. Nei giorni seguenti l’accasamento il gruppo accusava una forma respiratoria con mortalità, per questo motivo 7 soggetti deceduti erano conferiti presso il laboratorio della Sezione di Forlì dell’IZSLER per gli accertamenti diagnostici. Tutti i soggetti si presentavano febbricitanti con essudato nasale, catarro in laringe con epatosplenomegalia e aerosacculite toracica e addominale. A questo punto si procedeva al prelievo di campioni per la ricerca di *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum* ed *Escherichia Coli*. Il gruppo di animali non ancora in produzione è stato sottoposto a terapia antibiotica specifica. La deposizione quindi partiva con una certa progressione e regolarità. A 19 settimane venivano controllati nuovamente 9 soggetti deceduti con i residui della forma batterica setticemica, contemporaneamente si procedeva alla ricerca mediante tecniche di PCR e di RT-PCR del virus IB e dei pneumovirus (Cavanagh et al., 1999) e del virus della Laringotracheite Infettiva (Callisson et al., 2007) partendo da prelievi di intestino, trachea e ovidutto. A 22 settimane di vita l’allevatore denunciava un arresto nella progressione della percentuale di ovodeposizione. Venivano consegnati al laboratorio 9 soggetti, 5 galline morte e 4 galline vive. Le quattro galline vive erano state scelte con accuratezza: una con cresta di aspetto e colore normale e tre con cresta piccola e pallida. Su queste si procedeva al prelievo di campioni ematici per accertamenti sierologici nei confronti delle seguenti varianti di IB: M41, 793B, D274, 1466 e nei confronti dei Mycoplasmi, della ND e dell’AVP. Quindi i soggetti venivano soppressi e tutti sottoposti ad esame necroscopico.

Risultati

A 16 settimane all'esame necroscopico prevalevano le lesioni respiratorie complicate da colli setticemia e gli esami di laboratorio risultavano positivi per *M.gallisepticum*, per *M.synoviae* e per *E.Coli*.

A 19 settimane all'esame necroscopico erano presenti gli esiti di forma respiratoria con pericardite e peritonite e ovarite. Gli esami di laboratorio risultavano positivi nuovamente per i due Mycoplasmi e per *E.Coli*, , risultava inoltre positiva la RT-PCR specifica per una porzione del gene S (subunità S1) del virus IB. Il sequenziamento dell'amplificato ottenuto, ha evidenziato la maggior identità nucleotidica (97.9%) verso il ceppo di referenza QXIBV. Le reazioni di sequenza sono state approntate a partire dal prodotto PCR previa purificazione su gel (Qiaquick Gel extraction kit - QIAGEN) con il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem) secondo le istruzioni del produttore, impiegando la stessa coppia di primers utilizzata nell'amplificazione (XCE1+, XCE3-). Le reazioni di sequenza sono state sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga 3130 (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v7.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). A 22 settimane all'esame necroscopico una delle 5 galline pervenute morte presentava addome dilatato, teso e fluttuante per anomalia dell'ovidutto che si presentava estremamente dilatato con assottigliamento della parete per raccolta di un abbondante quantità di trasudato (circa 1 litro) con tendenza all'atrofia ovarica. Due delle galline pervenute vive si presentavano impuberi con mancato sviluppo dell'apparato riproduttore con ipotrofia ovarica e oviduttale, mentre una presentava iperfollicolite ovarica e cisti oviduttale di media dimensione tra magnum e istmus. A questo punto si emetteva il fondato sospetto di "false layers" come conseguenza di un'infezione precoce da IB.

Contemporaneamente sei soggetti su nove presentavano una grave tiflite emorragica da *E.tenella*.

Sierologicamente risultavano positive per i Mycoplasmi, per AVP, per le varianti IB saggiate a basso titolo, per ND a basso titolo.

Considerazioni

Il caso clinico descritto ha dimostrato la stretta correlazione fra virus IB e la lesione dell'ovidutto che caratterizza le cosiddette "false ovaiole". Non risulta facile stabilire in percentuale il numero di galline che possono esserne colpite per vari motivi. Uno di questi motivi consiste nel fatto che il caso è troppo recente e solo con il proseguo si potranno fare delle valutazioni più precise. Un altro motivo per cui questa valutazione non è facile, specialmente nella fase iniziale, dipende che all'esame clinico generale di un gruppo colpito e allevato in batteria, le galline false ovaiole non manifestano alcuna anomalia esteriore e sono morfologicamente indistinguibili dagli altri soggetti, anzi appaiono in ottimo stato di nutrizione e ben impiumate. Nei casi più avanzati, invece, si possono notare alcuni soggetti, immediatamente identificabili come false ovaiole, con un atteggiamento caratteristico detto a "pinguino" dovuto all'addome a bisaccia. La causa di questo atteggiamento sono le cisti con raccolta di liquido trasudato nel lume stesso dell'ovidutto, le cui pareti si dilatano a dismisura fino a contenere anche 1,5 litri di liquido. L'ovaio rimane attivo, ma la salpinge e l'ovidutto non

sono in grado di accogliere né tanto meno di far proseguire l'ovulo maturo. Nella maggior parte dei casi, per contro, la lesione più comune risulta in un restringimento o atresia dell'ovidutto. Già a 5/6 settimane di età il sistema riproduttore immaturo infettato può subire alterazioni con formazione di ovidutti malformati e parzialmente atrofizzati.

Nel caso descritto la percentuale di deposizione si è portata al % a 24 settimane di vita contro il % previsto per la razza e l'età in mancanza di patologie.

La sensazione che se ne ricava è che l'evento "false ovaiole" nel gruppo di galline considerato non determini una elevata percentuale di mancata produzione (30-50%) come descritto in altri episodi, ma possa essere contenuta fra il 5-10% dal momento che le pollastre hanno avuto due vaccinazioni precoci con due ceppi diversi nei primi dieci giorni di vita, per cui anche di fronte ad un'infezione precocissima, una gran parte dei soggetti risultava possedere una buona copertura vaccinale.

Infatti, De Wit (2006) in seguito a diverse prove vaccinali sperimentali condotte nei riproduttori e nella progenie, conclude che 1) gli anticorpi neutralizzanti omologhi sono protettivi; 2) quanto maggiori sono i livelli anticorpali dei riproduttori, tanto migliore è la protezione della progenie. Sono auspicabili livelli $\geq 10 \log_2$; 3) elevati livelli anticorpali nei riproduttori si raggiungono con l'uso di vaccini inattivati con più sierotipi di IBV; 4) l'ideale sarebbe un vaccino omologo.

Concludendo, non potendo attualmente disporre del vaccino omologo, si può affermare che al fine di proteggere le ovaiole da questa patologia occorre allevare pulcini per gruppi omogenei con titoli passivi per IB elevati ed omogenei e procedere precocemente alla copertura vaccinale con i diversi ceppi vaccinali a disposizione in commercio.

Ringraziamenti

Si ringrazia tutto il personale tecnico della Sezione di Forlì per la gentile collaborazione

Bibliografia

1. Bano L., Bellato S., Cocchi M., Terregino C., Vascellari M., Agnoletti F. 2006. Elevata incidenza di "false ovaiole" in un gruppo di galline commerciali. Atti del XLV Convegno annuale SIPA. p.29.
2. Beato M.S., De Battisti C., Terregino C., Drago A., Capua I., Ortali G. 2005. Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *Veterinary Record*, 156:720.
3. Callison SA, Riblet SM, Oldoni I, Sun S, Zavala G, Williams S, Resurreccion RS, Spackman E, García M. 2007. Development and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. *J Virol Methods*. Jan;139(1):31-8.
4. Cavanagh D., Mawditt 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 Pathol* .28, 593-605.
5. De Wit J.J., 2006. Un nuovo capitolo sull'argomento false ovaiole. Atti della Giornata di Studio Intervet, Bologna, 7 giugno 2006.

6. Landman W.J.M., Dwars R.M., De Witt J.H..2005.High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection.Proc.of the fifty-fourth Western Poultry Disease Conference, Vancouver, Canada, 25-27 April.
7. Massi P.,2006.Epidemiologia della Bronchite Infettiva in Italia. Atti della Giornata di Studio Intervet, Bologna, 7 giugno 2006.
8. Shengwang L., Xiangang K., 2004.A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non vaccinated flocks in China.Avian Pathology,33(3):321-327.



Innovazione e Ricerca al servizio della produzione animale

-  **Soddisfazioni per i professionisti**
-  **Benessere per gli animali**
-  **Rispetto per l'ambiente**

INFEZIONE SPERIMENTALE CON I CEPPI DI CAMPO “ITALY-02”, “QXLIKE” E “793B” DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN POLLI DA CARNE COMMERCIALI VACCINATI CON VACCINO VIVO CONTENENTE I CEPPI H120 E D274

Massi P.¹, Tosi G.¹, Taddei R.¹, Fiorentini L.¹, Sani P.²

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione di Forlì*

²*Fort Dodge Animal Health S.P.a.*

Abstract

The ability of a live attenuated bivalent vaccine (including M41 e D274 vaccine strains) to protect against field infectious bronchitis virus (IBV) strains as Italy 02, Qxlike and 793B was investigated using commercial broilers. Protection, as measured by assensing ciliary activity of the tracheal epithelium following challenge, was excellent against field infectious IT02 and QXlike strains and good against 793B strain. Virological and serological laboratory investigations have been performed on all groups.

Riassunto

Il lavoro consiste in una prova sperimentale in broiler al fine di valutare la protezione indotta da un vaccino vivo attenuato contenente i ceppi M41 e D274 del virus della Bronchite Infettiva aviare effettuato ad un giorno di vita nei confronti dell'infezione sostenuta dai ceppi di bronchite infettiva aviare (IB) noti come Italy02, QXsimile e 793B. Il livello di protezione è stato calcolato attraverso la valutazione della ciliostasi osservata su colture d'organo (anelli tracheali). Sono stati rilevati buoni indici di protezione nei confronti dei ceppi IT02 e QX simile e soddisfacente indice di protezione nei confronti del ceppo 793B. Inoltre sono state valutate le risposte anticorpali alla vaccinazione e alle infezioni.

Introduzione

La Bronchite Infettiva aviare in Italia è la patologia respiratoria virale più diffusa nel pollo con caratteristiche di epidemia in zone avicole densamente popolate. Lo scopo del presente lavoro era quello di dimostrare l'efficacia della vaccinazione con vaccino vivo bivalente ad 1 giorno di vita nel pollo da carne attraverso la messa in evidenza della cross-protezione nei confronti di infezioni eseguite con i ceppi di campo Italy 02, QXsimile e 793B.

Materiali e metodi

Strutture e animali utilizzati nella prova

La prova di infezione sperimentale è stata condotta in Italia, nelle strutture della Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Sono stati utilizzati 100 polli da carne commerciali Ross 708 di sesso femminile. Al primo giorno di vita 25 pulcini sono stati salassati per valutare i livelli di anticorpi

di origine materna nei confronti della *Bronchite Infettiva aviare*, del *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*.

I 75 polli rimanenti sono stati suddivisi, secondo il criterio random, in cinque gruppi di 15 animali ciascuno, e immessi in unità isolanti (Montair Andersen HM® 1500), dove sono stati mantenuti durante tutto il corso della prova con alimentazione ed acqua di bevanda “*ad libitum*”.

Vaccino e protocollo sperimentale

Per la vaccinazione è stato utilizzato un vaccino vivo attenuato contro la Bronchite Infettiva Aviaria (IB) disponibile in commercio, contenente due diversi ceppi del virus IB: il ceppo H120 appartenente al sierotipo Massachusetts ed il ceppo variante Olandese D274.

Il vaccino liofilizzato è stato ricostituito, in condizioni di asepsi, in acqua distillata in modo da ottenere una dose in 0,1 ml.

I gruppi n. 1/2/3/4 sono stati vaccinati ad un giorno per via oculo-congiuntivale con il vaccino bivalente, mentre il gruppo n.5 non è stato vaccinato per IB ma solo infettato (controllo positivo) con il ceppo 793B variante inglese, come è rappresentato in tabella n.1.

Tabella 1. Riepilogo dei gruppi e dei rispettivi trattamenti.

Gruppo	Vaccinazione	Infezione Con ITO2	Infezione Con QX	Infezione Con 793B
n.1 controllo-	IB bivalente	no	no	no
n.2	IB bivalente	30gg		
n.3	IB bivalente		30gg	
n.4	IB bivalente			30gg
n.5 controllo+	NO			30gg

Sierologia

Al fine di valutare l’andamento degli anticorpi anti-IBV durante la prova, i polli di tutti i gruppi sono sottoposti a prelievi di sangue rispettivamente a 1, 30 e 45 giorni di età.

In particolare, il prelievo a 1 giorno d'età permette di rilevare il livello di anticorpi circolanti anti-IBV trasmessi dai riproduttori alla progenie (MDA), presenti al momento della prima vaccinazione. Inoltre, è stata valutata l'eventuale presenza di anticorpi di origine materna nei confronti di *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma sinoviae*.

A 30 giorni, il giorno dell'infezione sperimentale, viene valutata la risposta sierologica alla vaccinazione.

A 45 giorni d'età, al termine della prova, viene valutata la risposta anticorpale all'infezione e alle vaccinazioni/infezioni.

I titoli degli anticorpi anti-IBV sono misurati mediante l'impiego del kit ELISA commerciale PROFLOK® IBV ELISA kit (Synbiotics, USA) e del test H.I. (inibizione della emoagglutinazione) allestito con gli antigeni M41, 793B e D274.

I titoli degli anticorpi, anti-MG e anti-MS sono misurati mediante l'impiego di kit ELISA commerciali denominati, rispettivamente, PROFLOK® MG ELISA kit e PROFLOK® MS ELISA kit (Synbiotics, USA.)

Infezione sperimentale

Tutti i gruppi, eccetto il n.1 (controllo negativo), sono stati infettati all'età di 30 giorni con tre diversi ceppi di BI isolati dal campo.

- Il gruppo n.2 con il ceppo ITO2 FO4682/99
- Il gruppo n.3 con il ceppo QX simleFO 241400/07
- Il gruppo n.4 con il ceppo 793BFO16408/06
- Il gruppo n.5 (non vaccinato) con il ceppo 793BFO16408/07

Ogni pollo riceveva una dose infettante pari a 10^3 ID₅₀, disciolta in 0.1 ml di acqua distillata e somministrata mediante goccia oculo-nasale.

Parametri di valutazione

L'impatto dell'infezione sperimentale e l'effetto protettivo ottenuto mediante il programma di vaccinazione, è stato valutato eseguendo un monitoraggio individuale dei seguenti parametri: manifestazione di sintomi clinici riferibili a infezione da IBV, presenza di lesioni anatomo-patologiche all'apparato respiratorio e/o in altri organi o tessuti, grado di motilità ciliare a livello dell'epitelio tracheale rispettivamente 3 e 7 giorni dopo l'infezione (Cavanagh et al.1997), risposta sierologica nei confronti di IBV con re-isolamento e identificazione del virus IBV (Massi et al.2006; Massi et al.2009).

Rispettivamente a 3 e 7 giorni post-infezione, 5 animali per ogni gruppo venivano sottoposti ad eutanasia e ad esame autoptico per valutare eventuali lesioni macroscopiche, e allo scopo di prelevare le trachee per la valutazione della motilità ciliare e per il re-isolamento del virus dell'infezione sperimentale.

Quindici giorni dopo l'infezione i polli rimasti sono stati salassati, sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico.

Valutazione della motilità ciliare a livello dell'epitelio tracheale

Il metodo (J.Cook et al. 1999) prevede il prelievo delle trachee dagli animali da valutare. Ogni singola trachea viene posta in una provetta contenente 10 ml di terreno per tessuto-culture di organo (TOC). Con l'ausilio di un chopper, ciascuna trachea viene tagliata per ottenere degli anelli tracheali di 1 mm circa di spessore.

Vengono scelti 10 anelli (3 dalla parte superiore, 3 dalla parte inferiore e 4 dalla parte mediana dell'organo) per esaminare la motilità ciliare nei diversi tratti. Ogni singolo anello viene posto in una provetta con 1 ml di terreno per TOC. Una volta chiuse, le provette vengono sistemate in un rotatore (15 giri/ora) ed incubate a 37°C. Dopo 24 ore gli anelli tracheali vengono esaminati a 100 ingrandimenti, previa agitazione delle provette in vortex. A ciascun anello viene assegnato un punteggio da 0 a 4 secondo la scala seguente:

- 0 = motilità ciliare 100%
- 1 = motilità ciliare 75%
- 2 = motilità ciliare 50%
- 3 = motilità ciliare 25%
- 4 = motilità ciliare assente (100% di ciliostasi)

Per ogni trachea esaminata, il punteggio massimo potrà variare da 40 (nessuna protezione) a 0 (protezione completa). Quanto più basso sarà il punteggio, tanto maggiore sarà il livello di protezione; mentre un punteggio elevato indica protezione scarsa o nulla.

L'Indice di Protezione di ciascun di ciascun gruppo viene calcolato mediante la seguente formula:

$$\frac{[1 - \text{media punteggio di ciliostasi del gruppo vaccinato e infettato }] \times 100}{\text{media punteggio di ciliostasi del gruppo di controllo infettato}}$$

Più elevato sarà l'Indice di Protezione, maggiore risulterà l'efficacia del programma di vaccinazione e viceversa.

Re-isolamento ed identificazione dei virus BI

Si utilizzavano 5 uova embrionate SPF di pollo che venivano inoculate per via allantoidea a 10 giorni di età con tre passaggi a fondo cieco partendo da ogni prelievo.

L'identificazione era effettuata con la tecnica di RT-PCR (Cavanagh et al.199).

Risultati

I soggetti accasati nell'Unità Isolante n. 5 non vaccinati ed infettati con il ceppo 793B hanno presentato a partire dal terzo giorno post infezione una sindrome respiratoria con lacrimazione, scolo nasale, starnuti che si è protratta per almeno una settimana. Mentre i soggetti dei gruppi vaccinati (unità isolanti n. 2/3/4) e infettati con i tre diversi ceppi di virus bronchite non hanno manifestato sintomi respiratori.

Dopo 3 giorni e 7 giorni dal challenge venivano prelevati 5 soggetti per gruppo, su questi veniva eseguito il prelievo di sangue, quindi soppressi per eutanasia per l'esame necroscopico ed espantata la trachea per la valutazione dell'attività ciliare e per il reisolamento virale.

In seguito alla valutazione dell'attività ciliare veniva calcolata la media del punteggio di ciliostasi per ogni gruppo e l'indice di protezione ciliare come di seguito riportato.

Media del punteggio della ciliostasi fra i due prelievi

Unità isolante 1 (controlli vaccinati)	2.0
Unità isolante 2 (infettati IT02)	2.9
Unità isolante 3 (infettati QX)	7.3
Unità isolante 4 (infettati 793B)	11.9
Unità isolante 5 (c. infettati 793B)	34..3

Indice di protezione

Unità isolante 1	97
Unità isolante 2	94.5
Unità isolante 3	81.7
Unità isolante 4	68.3

Dopo 15 giorni dall'infezione venivano prelevati e soppressi tutti i polli rimanenti, sottosti a prelievo sierologico, ad esame necroscopico e prelievo di trachea e reni per il reisolamento virale.

Risultati virologici

La RT-PCR dei tre prelievi è stata eseguita su liquido allantoideo delle uova SPF inoculate al 1°, 2° e 3° passaggio con i seguenti risultati:

	I prelievo (3gg post-infezione)	II prelievo (7gg post-infezione)	III prelievo (15gg post-infezione)
U.I.n.1	Neg	Neg	Neg
U.I.n.2	Positivo	Pos.debole	Neg
U.I.n.3	Positivo	Positivo	Positivo
U.I.n.4	Positivo	Positivo	Positivo
U.I.n.5	Positivo	Positivo	Positivo

Risultati sierologici

1 giorno di vita

Elisa *Mycoplasma gallisepticum* e *synoviae*: negativi

Elisa Bronchite infettiva IDEXX tutti positivi alti

30 giorni

Titolo medio in HI

	M41	D274	793B
gruppo 1	1/32	1/32	1/16
gruppo 2	1/32	1/32	<1/16
gruppo 3	1/32	1/32	<1/16
gruppo 4	1/32	1/32	<1/16
gruppo 5	<1/16	<1/16	<1/16

A 30 giorni di vita sono risultati sieronegativi per il ceppo 793B variante inglese. Sono risultati sieropositivi bassi per il ceppo M41 classico e per il ceppo D274 variante olandese.

In Elisa sono risultati tutti negativi.

45 gg: controllo della risposta sierologica in HI alle infezioni indotte

Titolo medio in HI

	M41	D274	793B
gruppo 1	1/16	1/16	<1/16
gruppo 2	1/32	1/32	<1/16
gruppo 3	1/64	1/64	<1/16
gruppo 4	1/32	1/32	1/64
gruppo 5	1/16	1/16	1/64

Il gruppo 1 risulta sieronegativo

Il gruppo 2 presenta titoli sierologici bassi

Il gruppo 3 presenta titoli sierologici medio bassi nei confronti di D274 ed M41

Il gruppo 4 presenta titoli sierologici medio-bassi nei confronti dei ceppi saggiati

Il gruppo 5 presenta siero conversione solo nei confronti del ceppo 793B

Risultati sierologici in ELISA a fine prova

Per quanto attiene ai risultati sierologici in Elisa con il prelievo di fine prova a 45 giorni di vita, si evidenzia una netta risposta anticorpale nei gruppi vaccinati ed infettati ed una risposta debole o negativa nei gruppi solo vaccinato o solo infettato. Questo si spiega con il fatto che la vaccinazione viva effettuata ad un giorno stimola prevalentemente l'immunità mucosale e cellulo-mediata. Mentre l'infezione effettuata a 30 giorni nel gruppo 5 senza primer vaccinale non può stimolare da sola una netta risposta anticorpale.

D'altra parte nei gruppi vaccinati ad 1 giorno in cui il vaccino funziona anche da primer e stimolazione immunitaria l'infezione indotta a 30 giorni innesca facilmente una risposta anticorpale.

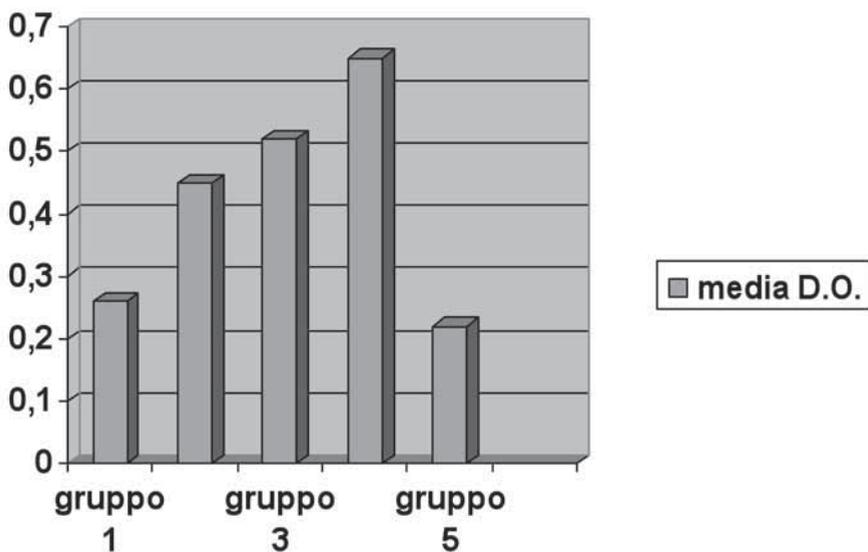
Rappresentazione grafica dei dati sierologici medi di D.O. dei valori con metodo ELISA a fine prova.

C+ 0,313

C- 0,050

Conclusioni

I ceppi di campo Italy 02, QXsimile e 793B sono circolanti e presenti in Italia nel pollame nelle varie tipologie produttive. In certe aree a produzione avicola intensiva dove la IB è endemica si assiste anche ad una cocircolazione di più ceppi di campo contemporaneamente. Si rende pertanto necessario proteggere il pollame con strategie vaccinali diversificate e ad ampio spettro immunitario.



La prova descritta ha messo in evidenza l'efficacia della vaccinazione a 1 giorno con vaccino vivo bivalente con ceppo M41 e D274 nei confronti dell'infezione effettuata a 30 giorni di vita con i tre diversi ceppi di campo a dimostrazione che un vaccino bivalente amplifica la stimolazione antigenica e prolunga la stimolazione immunitaria.

Ringraziamenti

Si ringrazia tutto il personale tecnico della Sezione di Forlì per la gentile collaborazione.

Bibliografia

1. Cavanagh D., Ellis M.M., Cook J.K. 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26, 63-74.
2. Cavanagh D., Mawditt 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 Pathol.* 28, 593-605.
3. Cook J.K.A., Orbell S.J., Woods M.A., Huggins M.B. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477-485.
4. Massi P., Tosi G., Meini A. 2006. Protection of chickens vaccinated with different schemes including the 4/91 IBV vaccine strain against field IBV strain Italy 02: preliminary results. *Ital. J. Anim. Sci.* 5, 302-308.
5. Massi P., Tosi G., Fiorentini L. 2009. Experimental infectious with the "IT-02" strain of avian Infectious Bronchitis virus in commercial broilers vaccinated with different vaccination programmes using live attenuated vaccines. XVth World Veterinary Poultry Association Congress - Marrakesh, Morocco, November 8-12, 2009.



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



TOSSINFEZIONE DA BOTULISMO IN POLLI COMMERCIALI

Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Taddei R.

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

Riassunto

Si descrive un episodio di tossinfezione da *Clostridium botulinum* tipo C che ha interessato un allevamento di broiler di 42 giorni di età nell'estate 2009. I fattori che hanno caratterizzato l'evento come l'insorgenza in una specie animale non comune a fenomeni di botulismo, la velocità di diffusione nei diversi capannoni che compongono l'allevamento, l'elevata percentuale di mortalità ci portano a dover considerare l'importanza degli effetti dell'intossicazione botulinica anche nell'allevamento intensivo italiano del pollo da carne.

Abstract

During the summer of 2009, a flock of commercial broiler chickens experienced unusually high death losses at 42 days of age. Six broilers were submitted to the IZSLER laboratory for assistance. The elevated mortality was associated with incoordination, flaccid paralysis of leg, wing and neck muscles. Type C botulinum was identified in hearth and ceca by mouse bioassay tests and PCR test.

Introduzione

Il botulismo è una sindrome neurologica caratterizzata da paralisi flaccida della muscolatura. Il botulismo colpisce l'uomo e numerose specie animali ed è causato dall'azione di una neurotossina prodotta da un batterio anaerobio e sporigeno, *Clostridium botulinum*. Esistono sette tipi di tossina botulinica (identificati con le lettere da A a G); i tipi C e D sono maggiormente coinvolti nel botulismo animale. Non tutti i ceppi di *Clostridium botulinum* sono tossinogeni, infatti dal punto di vista diagnostico l'isolamento del batterio non è sufficiente a confermare la malattia, ma è necessario dimostrare la presenza della tossina. L'abitat principale di *Clostridium botulinum* è l'ambiente. La resistenza delle spore a numerosi agenti chimici e fisici consente al batterio di sopravvivere per lunghissimi periodi di tempo.

In condizioni favorevoli le spore germinano producendo la forma vegetativa del batterio che si moltiplica e produce la tossina. I ceppi di *Clostridium botulinum* non hanno la medesima ripartizione geografica: per esempio i ceppi C e D hanno una temperatura ottimale di crescita compresa fra i 30 e i 40°C e sono particolarmente esigenti di materia organica, per questa ragione si ritrovano soprattutto in zone ricche di sostanza organica di paesi caldi e di regioni temperate durante i mesi estivi.

Nel settore avicolo il botulismo è una patologia nota da molto tempo nelle anatre e nelle specie acquatiche. Casi di botulismo non sono rari anche nel fagiano. La presenza di acque stagnanti ricche di materia organica favorisce la moltiplicazione dei clostridi e la produzione della tossina. Le carcasse degli animali deceduti costituiscono una ricca fonte di tossina botulinica favorendo così la diffusione della malattia. In tal senso è importante il ruolo degli insetti (larve e adulti) e di vermi terricoli che assumono la tossina e vengono successivamente ingeriti dai volatili.

Nel pollame industriale la segnalazione di casi di botulismo è sempre stata piuttosto sporadica. Tuttavia, in questi ultimi anni, sono aumentate le segnalazioni in gruppi industriali di polli da carne in diversi paesi europei. I focolai finora diagnosticati sono riconducibili ai tipi C e D, anche se non mancano segnalazioni relative al tipo E. Come fonte d'origine della contaminazione in alcuni casi si ipotizza l'impiego di acqua proveniente da laghi artificiali naturalmente contaminati (Carlier J.P. et al.). Una volta avviata, l'intossicazione si diffonde rapidamente attraverso l'ingestione delle carcasse degli animali deceduti e di adulti e larve di mosche e coleotteri. Dal punto di vista clinico il botulismo aviario è caratterizzato da un breve periodo di incubazione: da poche ore a 1-2 giorni in funzione della dose di tossina ingerita. Gli animali colpiti presentano una tipica paralisi flaccida che procede dalle zampe fino a raggiungere ali, collo e palpebre. La morte sopraggiunge per deficit cardiaco e respiratorio e per l'impossibilità di muoversi. In alcuni casi si osservano fenomeni diarroici e la presenza di eccessi di urati nelle deiezioni. Gli indici di morbilità e mortalità variano e possono raggiungere livelli molto elevati. Gli animali morti non presentano lesioni macroscopiche e microscopiche (Trampell et al. 2005).

Descrizione del caso clinico

Durante il mese di agosto 2009, un allevamento di circa 1 milione di polli da carne commerciali Ross 708 di 44 giorni di età presentava un mortalità elevata ed improvvisa.

I polli avevano avuto il seguente schema vaccinale: a 1 giorno di vita per Malattia di Gumboro, Bronchite Infettiva aviaria, Malattia di Newcastle e per Coccidiosi. In allevamento i polli erano stati sottoposti ad un richiamo vaccinale per Bronchite Infettiva aviaria e Malattia di Newcastle.

I soggetti erano alimentati con mangime composto prodotto nel mangimificio aziendale e sostituito con cadenze ravvicinate visto l'elevato numero di soggetti allevati. L'acqua di bevanda dal primo giorno era fornita da laghi artificiali circostanti l'azienda.

A 22 giorni di vita i polli venivano sottoposti a terapia antibiotica con amoxicillina per problemi enterici. A 28 giorni di vita appena terminata la terapia è iniziata la mortalità in alcuni reparti dell'azienda. La mortalità e la forma enterica facevano sospettare una forma di Malattia di Gumboro dal momento che la stessa azienda ne era stata colpita nel ciclo di allevamento precedente, ma gli esami di laboratorio eseguiti sulle borse di Fabrizio non portavano alla conferma diagnostica.

Nel frattempo la situazione clinica e la mortalità peggioravano tanto che a 44 giorni la patologia interessava quasi esclusivamente i soggetti maschi e la mortalità andava dall'1-2% al giorno di certi reparti al 10% al giorno in altri reparti. Neppure la pratica del diradamento delle femmine ed una successiva terapia con tylosina portava ad un miglioramento della situazione. La sintomatologia clinica era rappresentata da animali molto prostrati con il becco appoggiato a terra, anoressia e rigurgito di saliva che fuoriusciva dal becco tenuto penzoloni. Colpiti anche soggetti sviluppati e cresciuti molto bene. In poche ore i soggetti passavano dalla fase di prostrazione ad una sorta di paralisi flaccida degli arti inferiori, delle ali e del collo fino alla morte.

Sulla base del sospetto clinico di botulismo i soggetti venivano trattati con penicillina (20 mg/Kg per 5 giorni).

Esame autoptico

I soggetti pervenuti vivi all'IZSLER-Sezione di Forlì all'età di 44 giorni presentavano un'incoordinazione dei movimenti, paralisi flaccida degli arti, delle ali e dei muscoli del collo, una postura del corpo caratterizzata da abbassamento ed incurvamento del collo con presenza di diarrea. I dati anamnestici e l'aspetto clinico conducevano fortemente al sospetto di botulismo, anche se il botulismo in Italia negli ultimi anni non è mai stato segnalato nell'allevamento intensivo del broiler e quindi rappresenta un evento raro.

A livello anatomopatologico si evidenziava solo una enterite catarrale .

Si prelevavano il cuore, il fegato e l'apparato gastroenterico ai fini dell'isolamento della forma vegetativa del batterio e della messa in evidenza della tossina botulinica tramite prova biologica su topolino.

Dopo 5 giorni al laboratorio pervenivano due campioni di acqua, uno prelevato direttamente dal lago ed uno prelevato in allevamento dall'impianto di raffreddamento e un campione costituito da un pool di coleotteri ambientali per la ricerca del *Clostridium botulinum*.o della tossina.

I campioni venivano processati direttamente su coltura e per inoculazione su topini.

Esami di laboratorio

Gli organi venivano messi in coltura per l'isolamento del Clostridio secondo la tecnica descritta dal metodo di prova interno MP23/05 Rev.2.

L'omogenato d'organi era suddiviso in due aliquote, una di queste veniva trattata termicamente a 80°C per 10 minuti (Cook et al., 1998).

Con ognuno dei due omogenati d'organo venivano inoculati due topolini per via sottocutanea e due topolini per via endoperitoneale.

I campioni di acqua e i coleotteri venivano processati in modo analogo ai visceri animali.

I ceppi di Clostridi isolati venivano identificati biochimicamente (Lindstrom et.al., 2006), reinoculati nei topolini (Cook et al.,1998) e sottoposti alla tecnica di PCR per l'identificazione del tipo di tossina (Franciosa et al., 1996; Szabo et al., 1993).

Risultati

Il batterio veniva isolato direttamente dal cuore e intestino degli animali esaminati, dall'acqua di allevamento e dal pool di coleotteri e identificato come *Clostridium botulinum*.

La prova biologica risultava positiva dall'omogenato d'organi, dal campione d'acqua prelevata in allevamento e dal pool di coleotteri.

In particolare, dopo 24 e 36 ore morivano i topolini inoculati per le diverse vie con l'aliquote trattata termicamente da omogenato d'organo degli animali morti a dimostrazione della presenza della tossina botulinica.

Dopo 36 ore venivano a morte i due topolini inoculati per via endoperitoneale con l'aliquote trattata termicamente da omogenato di pool di coleotteri.

Anche l'acqua di allevamento trattata termicamente e inoculata nei topolini li portava a morte in 24-36 ore per via endoperitoneale.

La coltura di *C.botulinum* ottenuta, inoculata nei topolini li portava a morte dopo 24 ore con reisolamento dello stesso dal fegato.

Le PCR eseguite sui Clostridi isolati dagli animali e dall'acqua di allevamento sono risultate positive per *Clostridium botulinum* tipo C (Franciosa et al., 1996).

Considerazioni

Il caso clinico descritto presenta delle caratteristiche uniche per la realtà avicola italiana del pollo da carne sia per l'elevata perdita di animali che per le possibili implicazioni sulla salute umana che comunque si sono dimostrate prive di importanza in seguito alla tipizzazione del tipo di tossina.

In diversi Paesi Europei (Francia, Inghilterra, Germania e Svezia) negli ultimi anni ci sono state diverse segnalazioni di casi di botulismo nel broiler, nel tacchino e nella gallina. L'episodio qui descritto si inserisce nella casistica europea, inoltre le indagini eseguite ci hanno portato ad identificare nell'acqua di bevanda il primo "movens" per l'introduzione del botulino in azienda. La stagione molto calda, le acque stagnanti da giorni e l'improvvisa pioggia dei giorni precedenti le prime mortalità che potrebbe aver riportato in superficie il batterio e/o le tossine in concentrazione tale da infettare per ingestione con l'acqua di bevanda i soggetti in esame, sono le cause favorevoli dell'insorgenza della tossinfezione. In seguito l'elevata concentrazione dei coleotteri ambientali anch'essi infettati può aver amplificato il problema quando ingeriti dai polli. Anche il fenomeno del cannibalismo dei polli morti contribuiva alla diffusione della tossinfezione con ingestione di tossine preformate.

Conclusioni

La mortalità in azienda, dopo l'utilizzo della penicillina, la rimozione immediata dei soggetti che venivano a morte, la sostituzione dell'acqua di bevanda dei lagoni con acqua dell'acquedotto, ha portato ad una netta riduzione della mortalità giornaliera dal 5-10% all'0,1% circa nei capannoni maggiormente colpiti. Gli animali dei capannoni non colpiti venivano prontamente mandati alla macellazione, mentre negli capannoni colpiti si aspettava la riduzione totale della mortalità e la tipizzazione del tipo di tossina per l'invio al macello.

Bibliografia

1. Carlier J.P. et al. 2002. Bulletin Acad. Vet. de France, vol. 155 p.295-302.
2. Cook L.V., Lee W.H., Lattuada C.P., Ransom G.M. 1998. Methods for the detection of *Clostridium botulinum* toxins in meat and poultry products. USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 3rd Edition/1998.
3. Franciosa G, Fenicia L, Caldiani C, Aureli P. 1996. PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. J Clin Microbiol. Apr;34(4):882-5
4. Lindstrom M., Korkeala H. 2006. Laboratory Diagnostics of botulism. Clinical Microbiology Review, April, p.298-314.
5. Szabo EA, Pemberton JM, Desmarchelier PM. 1993. Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. Sep;59(9):3011-20.
6. Trampel D.W., Smith S.R., Rocke T.E. 2005. Toxicoinfectious Botulism in commercial caponized chickens. Avian Diseases, Vol.49, n.2, p.301-303.

CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI CEPPI DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO ISOLATI IN ITALIA NEL PERIODO 2006-2009

Moreno A.¹, Barbieri I.¹, Ceruti R.², Morandini E.³, Cordioli P.¹

- 1- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia
- 2- Gesco consorzio cooperativo, Cazzago San Martino, Bs
- 3- Veronesi Verona Spa., Verona

Introduzione

La bursite infettiva (IBD) rappresenta da tempo, ed in particolare negli ultimi decenni, un importante problema, non solo economico, dell'allevamento avicolo intensivo. Fino alla fine degli anni '80, infatti, la malattia veniva controllata abbastanza facilmente mediante misure di profilassi indiretta (vaccinazione). Tuttavia, successivamente, si sono registrati, in varie parti del mondo dove l'avicoltura intensiva è più sviluppata, numerosi casi di "rottture vaccinali" causate dall'insorgenza di "nuove varianti" virali. Negli USA è stato dimostrato che in queste "nuove varianti" (US variants) si era realizzato un *drift* antigenico con conseguente mancata risposta anticorpale crociata tale da rendere i vaccini classici non sufficientemente protettivi (7, 10). Inoltre, la comparsa di quadri di IBD acuta caratterizzati da mortalità elevate, sono stati riportati in Europa ed attribuiti a ceppi dotati di elevata patogenicità, i c.d. "very virulent", anche in assenza di *drifts* antigenici significativi (4). In Italia, casi di IBDV sono stati riportati alla fine degli anni novanta, soprattutto in Emilia Romagna dove la malattia poteva essere considerata endemica. A partire del 2002, si è registrato un notevole aumento di casi anche in altre regioni italiane.

Il virus IBDV appartenente alla famiglia Birnaviridae, è un virus a RNA privo di envelope, con genoma a RNA a doppia elica bisegmentato. Sono riconosciuti due sierotipi. Il sierotipo 1 è il ceppo patogeno del pollo, di cui si conoscono diversi ceppi o varianti: il ceppo classico (prototipo F52/70), varianti, very virulent (divise in tipiche e atipiche) e vaccinali (*mild, mild intermediate, intermediate, intermediate plus*). Il sierotipo 2, isolato inizialmente nel tacchino ma diffuso anche nel pollo, è apatogeno. Strutturalmente sono note 5 proteine: VP1 che codifica per la RNA polimerasi; VP2 che induce Ac neutralizzanti e presenta gli Ag specifici di sierotipo; VP3 che presenta gli Ag specifici di gruppo; VP4 che codifica per la proteasi virale; VP5 che ha funzioni regolatorie. In particolare nella VP2 c'è una piccola regione, denominata ipervariabile, di soli 144 amminocidi (aa) estremamente idrofoba, con due picchi idrofili agli estremi localizzati in posizione 210-225 e 312-324 rispettivamente (picchi maggiori A e B) che corrispondono agli epitopi neutralizzanti (1, 2). Inoltre è stata riportata anche la presenza di altre due picchi idrofili minori 1 e 2 (posizioni 248-252 e 279-290) altrettanto importanti dal punto di vista antigenico (13) poiché è proprio in queste regioni che più spesso insorgono mutazioni, spesso puntiformi, che determinano la comparsa di nuovi sierotipi o varianti patogene.

Studi di caratterizzazione antigenica e genomica condotti precedentemente su ceppi isolati dal 1996 al 2005 (9, 11) hanno rilevato che la maggior parte dei ceppi IBDV circolanti nel territorio italiano appartenevano al tipo vvIBDV. Tuttavia era stato osservato che alcuni ceppi vvIBDV, provenienti principalmente dall'Emilia Romagna,

presentavano caratteristiche sia antigeniche che genomiche diverse dai ceppi vvIBDV tipici. Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto l'approfondimento dello studio dei virus IBDV circolanti in Italia mediante la caratterizzazione genomica dei ceppi di IBDV isolati negli anni 2006-2009 per rilevare la comparsa di eventuali ceppi atipici.

Materiali e metodi

Campionamento

Lo studio è stato condotto su borse di Fabrizio di animali provenienti da allevamenti con sintomatologia clinica e/o lesioni riferibili a malattia di Gumboro. Le forme cliniche osservate erano, in generale, non molto gravi con edema o atrofia della borsa di Fabrizio e lieve aumento della mortalità. Solo in pochi casi è stata riportata mortalità elevata superiore al 6-7%. I materiali patologici provenivano da allevamenti di broiler e di pollastre da diverse regioni italiane raccolti nel periodo 2006-2009. In tutti gli allevamenti veniva applicata la vaccinazione con diversi ceppi attenuati di IBDV.

rt-PCR

I campioni sono stati testati per rilevare la presenza del genoma virale tramite la metodica rt-PCR descritta da Eterradossi (6). Detta metodica utilizza primers specifici che amplificano un frammento di 516bp del segmento A del genoma codificante la regione ipervariabile (HVR) della VP2.

Isolamento virale

I campioni risultati positivi alla rt-PCR sono stati in seguito inoculati in uova embrionate di pollo SPF di 9-11 g d'età sulla membrana corion-allantoidea per l'isolamento virale secondo la metodica descritta nel manuale OIE (8).

Sequenziamento ed analisi filogenetica

La caratterizzazione molecolare è stata condotta sui prodotti ottenuti dalla rt-PCR IBDV che corrispondono alla porzione del segmento A che codifica la HVR della VP2. Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento disponibili in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default con il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Neighbor-joining con il programma MEGA 4.0.

Risultati

Negli ultimi 3 anni sono stati diagnosticati 92 casi di IBDV, 9 nel 2006, 23 nel 2007, 31 nel 2008 e 29 nel 2009. La caratterizzazione genomica è stata condotta su 83 ceppi, dei quali 18 isolati nel Veneto, 19 in Lombardia, 24 in Emilia Romagna, 1 in Trentino, 2 in Piemonte, 8 in Abruzzo, 3 in Molise, 3 in Marche, 3 in Puglia, 1 in Umbria ed 1 in Campania. Tutti i ceppi tranne 2 sono stati isolati da broiler con età comprese tra 24 e 52 giorni. I due restanti provengono da pollastre di 5-6 settimane di età.

L'analisi filogenetica comparativa delle sequenze dei ceppi italiani e dei ceppi di riferimento depositate in GenBank ha rilevato che il 60% (50/83) dei ceppi italiani circolanti nel 2006-2009 si collocano nel cluster dei ceppi vvIBDV. Il restante 40% (33) si divide in due gruppi. Un gruppo di 27 campioni comprende ceppi altamente correlati con i ceppi classici vaccinali. Gli altri 6 ceppi clusterizzano con i ceppi classici circolanti in Europa fino agli anni 80 ed i ceppi attenuati, ma formano comunque un gruppo chiaramente distinguibile. (figura n.1).

I ceppi di campo collegati ai ceppi IBDV vaccinali sono divisi in: 7 ceppi altamente correlati con il ceppo 228E; 12 con il ceppo Bursine 2; 2 col il ceppo Transmune e 6 ceppi con i ceppi D78 e Gumbovax.

Il confronto delle sequenze aminoacidiche dedotte dei ceppi di campo con i ceppi IBDV di riferimento ha evidenziato all'interno dei ceppi italiani vvIBDV un gruppo di 25 che presenta le 4 mutazioni aminoacidiche caratteristiche dei ceppi vvIBDV tipici (P222A, V256I, L294I, N299S) (3, 12,14). I restanti 25 ceppi presentano altre mutazioni. Un gruppo interessante è formato da 20 ceppi con una mutazione in posizione 254 (G254S) già osservata in precedenza in alcuni ceppi caratterizzati antigenicamente e genomicamente (9). La caratterizzazione antigenica, condotta con una metodica Antigen capture ELISA (AC-EL) utilizzando un pannello di 8 anticorpi monoclonali neutralizzanti (5, 6, 9), aveva rilevato che detta mutazione, seppur non localizzata all'interno dei picchi idrofili maggiori e minori, formava parte di un epitopo neutralizzante riconosciuto dal Mab 5. Tra questi 20 ceppi, 10 hanno anche delle mutazioni aa all'interno del picco idrofilico maggiore A: 5 in Y220F, stessa mutazione riscontrata nel ceppo vvIBDV atipico Egypt 99323 (7); 3 in Q221K ed infine 2 in D213N, mutazione osservata anche nella US variant E. Inoltre, un altro ceppo presenta una mutazione in pos 250 (Q250K) all'interno del picco idrofilico minore caratteristica di tutte le US variants.

Altri 3 ceppi presentano delle mutazioni aa localizzate in un'altra delle zone antigeniche importanti nel picco idrofilico maggiore B. Due ceppi possiedono la mutazione (A321T) riscontrata anche nel ceppo Egypt 99323 e la US variant GLS, mentre l'altro presenta la mutazione (K316R) presente nella US variant A.

L'analisi amminoacidica dei 6 ceppi correlati ai ceppi classici (F52/70) ha evidenziato la presenza di 8-12 aa diversi rispetto al ceppo classico F52/70; alcuni di questi sono caratteristici delle varianti americane.

Per quanto riguarda i ceppi correlati ai ceppi attenuati, i 6 ceppi del cluster 228E-like ed i 2 ceppi del cluster del ceppo Transmune-like presentano una identità amminoacidica del 100% con i ceppi attenuati 228E e Transmune rispettivamente. All'interno del gruppo dei ceppi di campo correlati al ceppo Bursine 2 si evidenziano delle variazioni aa (da 2 a 4 aa) rispetto al ceppo vaccinale. L'ultimo gruppo di ceppi correlati ai ceppi attenuati D78 e Gumbovax si caratterizza per la presenza di una mutazione in posizione 253 all'interno del picco idrofilico minore 1.

Discussione

Il principale scopo di questo lavoro è stato l'approfondimento dello studio genomico dei ceppi di IBDV circolanti in Italia dal 2006 al 2009 al fine di comparare la situazione epidemiologica attuale con quella riscontrata in precedenza negli anni 2002-2005 (9). Nel periodo 2006-2009 sono stati diagnosticati 92 casi di IBDV, dei quali 83 sono stati ulteriormente studiati tramite caratterizzazione genomica. I ceppi studiati sono rappresentativi della realtà avicola italiana in quanto provengono soprattutto da Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna (61/83) ma anche da altri 8 regioni italiane (22/83). Tutti i casi riguardano allevamenti in cui la vaccinazione veniva applicata. I vaccini maggiormente utilizzati erano Gumbovax e Gumbovax plus (Merial), D78 e 228E (Intervet), Transmune (CEVAC) e Bursine2 (Fort Dodge); per questo motivo i ceppi vaccinali sono stati sequenziati e utilizzati come ceppi di riferimento nella analisi filogenetica.

Come negli anni precedenti è risultata prevalente la circolazione di ceppi vvIBDV ma, rispetto al passato, appare decisamente aumentata la presenza di ceppi cosiddetti “atipici” caratterizzati dalla presenza di mutazioni aminoacidiche all’interno della HVR VP2. Inoltre questi ceppi non sono stati identificati soltanto in Emilia Romagna come nel triennio precedente ma anche in altre regioni.

Va sottolineata l’individuazione di mutazioni aa localizzate nelle regioni antigeniche neutralizzanti, molte di queste sono state osservate anche nelle varianti americane. La rilevanza di questi cambiamenti appare decisamente elevata in quanto ad esse potrebbe essere attribuita la capacità di sfuggire all’azione neutralizzante degli anticorpi come già indicato per la variante americana GLS (12).

Altrettanto interessante appare l’aumento di ceppi dotati di una mutazione in posizione 254 già evidenziati negli anni precedenti (9). Questa mutazione si localizza vicino al picco idrofilico minore 1 e forma parte di un epitopo neutralizzante riconosciuto dal MAb 5 descritto da Eterradossi (5,6).

Di particolare importanza è il rilevamento di 27 ceppi correlati con i ceppi vaccinali, ma che, ad eccezione dei ceppi 228E-like, presentano differenze antigeniche verso i rispettivi ceppi attenuati. Considerato che molte di queste mutazioni si trovano in regioni che inducono la formazioni di anticorpi neutralizzati si potrebbe ipotizzare che si tratti di una conseguenza della pressione selettiva indotta dalla diffusione dalla vaccinazione.

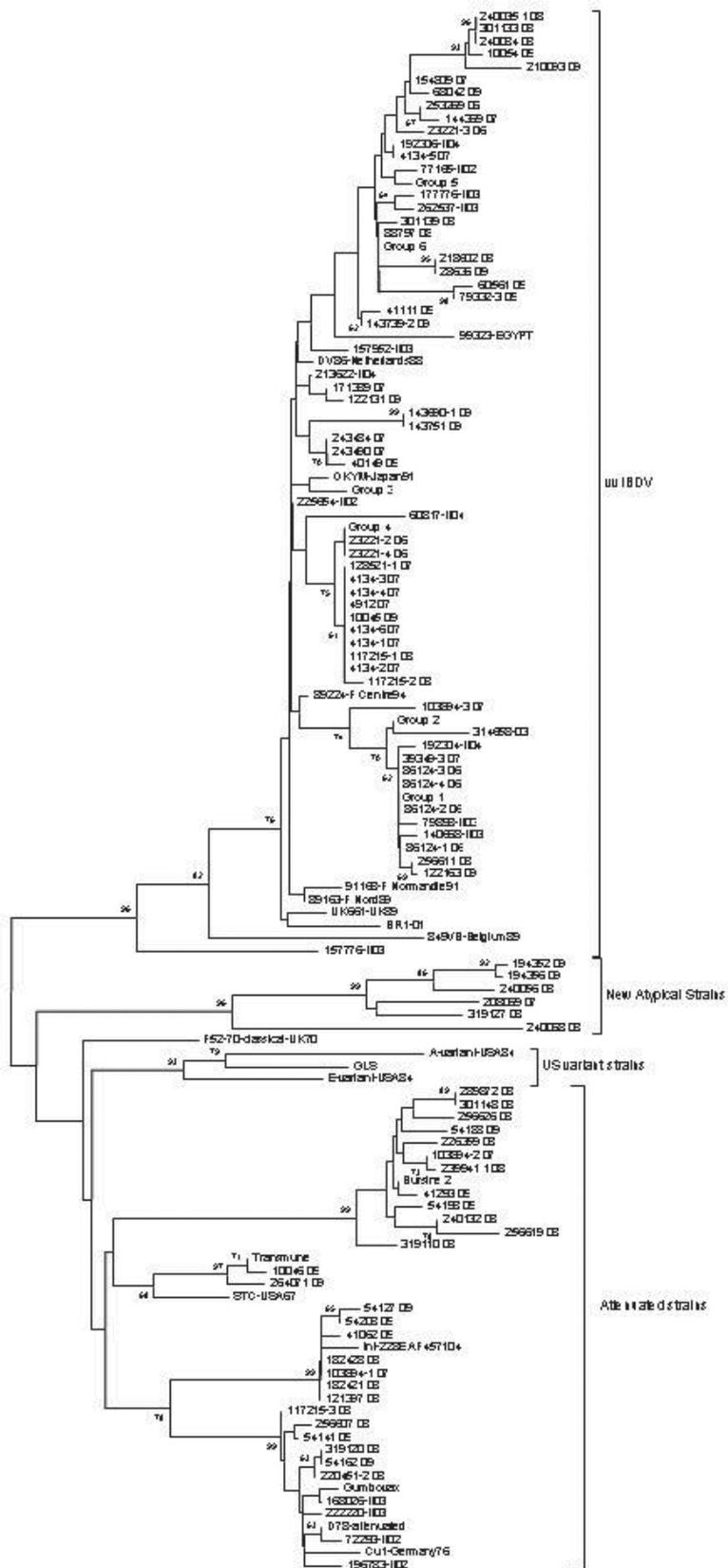
Infine la presenza di 6 ceppi correlati al gruppo dei ceppi classici, ma chiaramente distinguibile da loro è da considerare di grande rilevanza. L’approfondimento delle caratteristiche di questi ceppi, in particolare la definizione del patotipo sarà oggetto di ulteriori studi.

1. Azad et al. (1987), *Virology*, 161 :145-152
2. Bayliss et al. (1990), *J Gen Virol*, 71, 659-677
3. Brown et al. (1994), *J Gen Virol*, 75 :675-680
4. Chettle et al. (1989), *Vet Rec*, 125 : 271-272
5. Eterradossi et al. (1997a), *Arch. Virol.*,142, 255-270
6. Eterradossi et al. (1997b), *Arch. Virol.*,142, 2079-2087
7. Eterradossi et al. (2004), *Avian Pathol.*, 33, 423-431
8. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (2008), OIE, Infectious bursal disease, chapter 2.3.12
9. Moreno et al. (2007), *Av Dis*, 51 :863-872
10. Schnitzler et al. (1993), *J Gen Virol*, 74 :1563-1571
11. Tosi et al. (2002), *Proc. Cost Action 839*, Lyon 2000, pp.21-27
12. Vakharia et al. (1994), *Virus Res*, 31:265-273
13. Van den Berg et al. (1996), *Av Pathol*, 25:751-768
14. Van den Berg et al. (2004), *Av Pathol*, 33(5):470-476

Legenda Albero

Relazioni filogenetiche tra le sequenze parziali della VP2 dei ceppi di IBDV isolati nel periodo 2006-2009 e ceppi di riferimento disponibili in GenBank. L’albero è stato costruito con il metodo Neighbor-joining mediante software MEGA4.

Solo valori di bootstrap >60% sono mostrati.



0.01

UTILIZZO DEL PYROSEQUENZIAMENTO PER UNA RAPIDA CLASSIFICAZIONE DELLE SPECIE DI ADENOVIRUS AVIARI DEL GRUPPO I

Pizzuto M.S.^{1*}, De Battisti C.¹, Marciano S.¹, Capua I.¹ & Cattoli G.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, OIE/FAO and National Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease, OIE Collaborating Centre for Epidemiology Training and Control of Emerging Avian Diseases, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy.*

Abstract

Fowl adenoviruses (FAdVs) identification is relevant for epidemiological studies and for the adoption of a correct strategy where vaccination is to be used for the control of the disease. FAdVs typing is usually performed using PCR coupled with either conventional DNA sequencing or restriction enzyme analysis; however both methods can be time consuming and/or very expensive to be used as a routine tool. In this study PCR and subsequent pyrosequence analysis of the variable hexon L1 region were assessed in order to rapidly differentiate fowl adenovirus species. The results clearly demonstrate that pyrosequence analysis provides a new approach for a rapid differentiation and classification of fowl adenovirus that is faster, more cost-effective and easier to interpret than other techniques commonly used.

Riassunto

L'identificazione degli adenovirus aviari del gruppo I (FAdVs) è di notevole importanza sia per studi epidemiologici che per l'adozione di corrette strategie vaccinali, laddove la vaccinazione può essere impiegata nel controllo della malattia. La tipizzazione dei FAdVs è effettuata, in genere, mediante PCR seguita da sequenziamento o dall'analisi con enzimi di restrizione (RFLP). Entrambi i metodi risultano, tuttavia, molto dispendiosi sia in termini di tempo che economici rendendo difficoltosa la loro applicazione nella routine diagnostica.

Nel presente studio l'amplificazione della regione variabile L1 dell'esone seguita dal suo pyrosequenziamento è stata valutata al fine di consentire una rapida genotipizzazione delle specie di adenovirus aviari del gruppo I.

I risultati hanno dimostrato chiaramente che il pyrosequenziamento potrebbe costituire un nuovo strumento per identificare e classificare i FAdVs in maniera più rapida, economica e facilmente interpretabile rispetto alle tecniche comunemente utilizzate.

Introduzione

Gli adenovirus aviari del gruppo I (FAdVs), appartenenti al genere *Aviadenovirus* della famiglia *Adenoviridae*, sono diffusi in tutto il mondo e sono noti per essere causa di ingenti perdite economiche nell'avicoltura. Essi possono sia svolgere il ruolo di patogeni secondari nell'associazione con altri microrganismi sia essere direttamente responsabili di patologie specifiche quali inclusion body hepatitis (IBH) e hydropericardium syndrome (McFerran & Connor, 1977; Christensen & Saifuddin, 1989; Nakamura et al., 1999; Toro et al., 1999; Hess, 2000; Alvarado et al., 2007).

I FAdVs sono stati classificati in 5 specie (dalla A alla E) a seconda della loro struttura molecolare ed ulteriormente suddivisi in 12 sierotipi sulla base dei test di cross-neutralizzazione (Hess, 2000).

L'esone è la proteina principale del capsido virale sulla quale sono localizzati i determinanti specifici per il gruppo e il sottogruppo (Norby, 1969). Il gene dell'esone è costituito da regioni conservate (pedestals), che nella proteina si trovano maggiormente verso l'interno del virione, e da regioni variabili (loops), che protrudono dalla superficie del capsido (Roberts et al., 1986; Athappilly et al., 1994) e che contengono gli epitopi neutralizzanti tipo-specifici (Toogood et al., 1992; Adam et al., 1998). A causa dell'interazione con il sistema immunitario, l'identità di sequenza tra regioni variabili di specie differenti è bassa (Sheppard et al., 1995; Crawford-Miksza & Schnurr, 1996). Il loop 1 (L1) rappresenta la regione maggiormente variabile dell'esone ed è nota per essere la più utile per l'identificazione ed il differenziamento delle specie e dei sierotipi di FAdVs, attraverso l'accoppiamento della PCR con il sequenziamento o con l'analisi mediante enzimi di restrizione (RFLP) (Raue & Hess, 1998; Hess et al., 1999; Meulemans et al., 2001; Steer et al., 2009). Tuttavia tali metodiche richiedono molto tempo, spesso dando risultati di difficile interpretazione e con un costo per analisi che rende scarsamente efficace, dal punto di vista economico, il loro impiego come strumento diagnostico routinario.

Il pyrosequenziamento è stato impiegato con successo in diversi campi per la diagnosi e la genotipizzazione di microorganismi (Ronaghi & Elahi, 2002; Elahi et al., 2003; Swan et al., 2006; Deyde & Gubareva, 2009; Deyde et al., 2009; Quince et al., 2009). Sulla base di queste considerazioni, lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare un metodo rapido di classificazione delle specie di adenovirus aviari del gruppo I, basato sul pyrosequenziamento di un frammento di 30 paia di basi (bp) del loop 1 dell'esone.

Materiali e metodi

Virus. 22 ceppi di riferimento e 27 virus isolati di campo sono stati fatti crescere su monostrati di epatociti (CEL) ottenuti da embrioni di polli SPF di 14 giorni.

Amplificazione del Loop 1 mediante PCR. Sequenze del loop L1 ottenute da Genbank sono state allineate utilizzando il software MEGA 4.1 al fine di identificare una regione di 30 bp in grado di discriminare le diverse specie di FAdVs. La regione conservata a monte di queste 30 bp è stata utilizzata per disegnare i primer forward (FAdV-fw) per la reazione di PCR.

La PCR è stata effettuata utilizzando la coppia di primers FAdV-Pyro-fw ed Hexon B, quest'ultimo precedentemente descritto (Meulemans et al., 2001), generando un amplificato di dimensioni comprese tra 740 bp (FAdV-4, FAdV-10) e 765 bp (FAdV-5).

Sequenziamento e analisi in Blast. Le sequenze dei prodotti di PCR del loop 1, sono stati analizzati tramite ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem Inc.) ed allineate usando il programma Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per confermare l'identità dei ceppi virali. L'analisi filogenetica delle sequenze è stata svolta con l'ausilio del software MEGA 4.1 al fine di verificare il clustering dei vari ceppi nelle rispettive specie. **Pyrosequenziamento.** La reazione di PCR per il pyrosequenziamento è stata eseguita impiegando il primer reverse biotinilato (Hexon B [Biotag]). I prodotti di amplificazione sono stati immobilizzati su biglie di sefarosio ricoperte da streptavidina e lavati in una serie di buffers come raccomandato dalla

Biotage. I filamenti biotinilati di DNA sono stati ibridizzati il primer FAdV-Pyro-Fw in una piastra da 96 pozzetti e la reazione di pyrosequenziamento è stata effettuata nel pyrosequenziatore (Pyromark ID) seguendo le istruzioni del produttore. Le sequenze risultanti sono state analizzate e allineate per omologia a quelle, derivate da Genbank, presenti nella libreria “FAdV Library” usando il software IdentiFire (Biotage). L’accuratezza delle sequenze ottenute è stata confermata per confronto con quelle generate tramite il sequenziamento convenzionale.

Risultati e Discussione

Tutti i campioni testati hanno dato prodotti di PCR delle dimensioni attese in gel d’agarosio, senza bande aspecifiche. L’analisi delle sequenze dei ceppi di riferimento e degli isolati di campo ha confermato l’amplificazione della regione L1 e l’identità dei FAdVs analizzati.

I risultati del pyrosequenziamento si sono dimostrati coerenti con quelli derivati dal sequenziamento convenzionale e dalla successiva analisi filogenetica.

Basandosi su un frammento di 30 bp è stato possibile suddividere tutti i FAdVs testati (22 ceppi di riferimento e 27 isolati di campo) nelle corrette specie (A-E) e riuscire a tipizzare direttamente numerosi sierotipi (1, 2, 3, 5, 6, 9 e 11), laddove la classificazione stabilita sulla base dei risultati di cross-neutralizzazione rifletteva l’omologia di sequenza.

Tra i vari vantaggi del pyrosequenziamento vi è senz’altro quello di essere tollerante alle mutazioni. Spesso, infatti, gli isolati di campo presentano delle mutazioni nucleotidiche che possono determinare la scomparsa di un sito di restrizione nel caso della RFLP o lo shift della temperatura di melting nel caso dell’analisi HRM (High Resolution Melting-Curve). Questo può aumentare le difficoltà nell’identificazione dei virus e nella loro corretta classificazione. Nel nostro studio al contrario 27 isolati di campo sono stati analizzati dando altrettante sequenze con una accuratezza del 100% entro i primi 30 nucleotidi, grazie alla chimica della reazione di pyrosequenziamento.

Partendo dalla reazione di PCR il pyrosequenziamento richiede solo 2 ore per ottenere i risultati di 96 campioni, circa metà del tempo necessario per l’RFLP o per il sequenziamento convenzionale.

Tenendo conto di tutti i reagenti necessari, i costi stimati per il pyrosequenziamento sono circa la metà di quelli della reazione di sequenziamento convenzionale.

Conclusioni

Studi futuri saranno necessari per valutare le potenzialità del pyrosequenziamento per una rapida classificazione degli adenovirus aviari del gruppo I direttamente da campioni clinici (fegato, trachea, ovidutto per es.). Se l’esame diretto dovesse risultare applicabile la tempistica di analisi si ridurrebbe ulteriormente e si potrebbe in poche ore identificare la specie di adenovirus responsabile della problematica evidenziata in campo.

Nell’insieme il metodo di pyrosequenziamento descritto fornisce un nuovo strumento per la diagnosi e tipizzazione degli adenovirus aviari del gruppo I e pertanto potrebbe essere di supporto nell’identificazione e nella rapida classificazione delle diverse specie di FAdVs per la diagnostica routinaria, per studi epidemiologici e per la corretta applicazione delle strategie vaccinali.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato sponsorizzato dal Ministero della salute (Ricerca Corrente 29/07). Gli autori vogliono ringraziare il Dr. Thierry van den Berg Head of Avian Virology & Immunology Veterinary and Agrochemical Research Centre (VAR) Brussels per aver gentilmente fornito i seguenti ceppi di adenovirus aviari: 685, 75, 764, 58, 506, YR36, TR22, CR119, KR5, A-2A, X-11A, J2-A, C2B, IBH-2A, B3A, P7-A, 75-1A-1, T8-A.

Bibliografia

1. Adam, E., Nasz, I., Hudecz, F., Lengyel, A., Mezo, G. & Dobay, O. (1998). Characterization of intertype specific epitopes on adenovirus hexon. *Archives of Virology*. 143, 1669-1682.
2. Alvarado, I.R., Villegas, P., El-Attrache, J., Jensen, E., Rosales, G., Perozo, F. & Purvis, L.B. (2007). Genetic characterization, pathogenicity, and protection studies with an avian adenovirus isolate associated with inclusion body hepatitis. *Avian Diseases*. 51, 27-32.
3. Athappilly, F.K., Murali, R., Rux, J.J., Cai, Z. & Burnett, R.M. (1994). The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus 2, at 2.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 242, 430-455.
4. Christensen, N.H. & Saifuddin, M. (1989). A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. *Avian Diseases*. 33, 622-630.
5. Crawford-Miksza, L. & Schnurr, D.P. (1996). Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *Journal of Virology*. 70, 1836-1844.
6. Deyde, V.M. & Gubareva, L.V. (2009). Influenza genome analysis using pyrosequencing method: current applications for a moving target. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 9, 493-509.
7. Deyde, V.M., Nguyen, T., Bright, R.A., Balish, A., Shu, B., Lindstrom, S., Klimov, A.I. & Gubareva, L.V. (2009). Detection of molecular markers of antiviral resistance in influenza A (H5N1) viruses using a pyrosequencing method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 1039-1047.
8. Elahi, E., Pourmand, N., Chaung, R., Rofoogaran, A., Boisver, J., Samimi-Rad, K., Davis, R.W. & Ronaghi, M. (2003). Determination of hepatitis C virus genotype by Pyrosequencing. *Journal of Virological Methods*. 109, 171-176.
9. Hess, M. (2000). Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathology*. 29, 195-206.
10. Hess, M., Raue, R. & Prusas, C. (1999). Epidemiological studies on fowl adenovirus isolated from cases of infectious hydropericardium. *Avian Pathology*. 28, 433-439.
11. McFerran, J.B. & Connor, T.J. (1977). Further studies on the classification of fowl adenoviruses. *Avian Diseases*. 21, 585-595.
12. Meulemans, G., Boschmans, M., Berg, T.P. & Decaesstecker, M. (2001). Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian pathology*. 30, 655-660.
13. Nakamura, K., Mase, M., Yamaguchi, S., Shibahara, T. & Yuasa, N. (1999). Pathologic study of specific-pathogen-free chicks and hens inoculated with

- adenovirus isolated from hydropericardium syndrome. *Avian Diseases*. 43, 414-423.
14. Norby, E. (1969). The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. IV. Immunological complexity of soluble components. *Virology*. 37, 565-576.
 15. Quince, C., Lanzen, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M., Read, L.F. & Sloan, W.T. (2009). Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature methods*. 6 (9), 639-641.
 16. Raue, R. & Hess, M. (1998). Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *Journal of Virological Methods*. 73, 211-217.
 17. Roberts, M.M., White, J.L., Grutter, M.G. & Burnett, R.M. (1986). Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science*. 232, 1148-1151.
 18. Ronaghi, M. & Elahi, E. (2002). Pyrosequencing for microbial typing. *Journal of Chromatography B*. 782, 67-72.
 19. Sheppard, M., McCoy, R.J. & Werner, W. (1995). Genomic mapping and sequence analysis of the fowl adenovirus serotype 10 hexon gene. *Journal of General Virology*. 76, 2595-2600.
 20. Steer, P.A., Kirkpatrick, N.C., O'Rourke, D. & Noormohammadi, A.H. (2009). Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. *Journal of Clinical Microbiology*. 47, 311-321.
 21. Swan, D.C., Limor, J.R., Duncan, K.L., Rajeevan, M.S. & Unger, E.R. (2006). Human papillomavirus type 16 variant assignment by pyrosequencing. *Journal of Virological Methods*. 136, 166-170.
 22. Toogood, C.I., Crompton, J. & Hay, R.T. (1992). Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *Journal of General Virology*. 73, 1429-1435.
 23. Toro, H., Prusas, C., Raue, R., Cerda, L., Geisse, C., Gonzalez, C. & Hess, M. (1999). Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile. *Avian Diseases*. 43, 262-270.

Food Innovations



Agriculture



Animal Health



Food Safety



Packaging



Ingredients

Our investment in the science of food and nutrition extends from the fields where crops, fruit and vegetables are grown, to the tables where they are served. We are committed to and invest in advancing sustainable agriculture practices and developing more efficient ways of protecting crops and fresh produce.

We also work in partnership with the food manufacturing industry, supporting it with technology and expert advice in a large range of processes such as food safety, hygienic production environments, food preservation and freshness, printing of high impact graphics for packaging and cost effective waste management.

As today's consumers discover the health benefits of soy protein, we are also working with food manufacturers across Europe to develop innovative products that are high in protein, low in fat and have no cholesterol.



The miracles of science™

To find out more, visit: www.foodinnovations.dupont.com

USO DELLA TILVALOSINA (AIVLOSIN[®], ESTEVE S.P.A.) IN DUE GRUPPI DI TACCHINI COMMERCIALI BIG 6 AFFETTI DA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* E *MYCOPLASMA SYNOVIAE*. PROVE COMPARATIVE ESEGUITE A CONFRONTO CON TILOSINA E OSSITETRACICLINA

Rossi A.

Esteve S.p.A. , Via Ippolito Rosellini, 12, 20124 Milano

ABSTRACT

Questi 2 studi, realizzati presso un'azienda in provincia di Padova, mettono a confronto l'attività della tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A) e della tilosina nei confronti dell'infezione di campo da *Mycoplasma gallisepticum* in un allevamento di tacchini commerciali BIG 6 (primo studio); inoltre nel secondo studio il confronto è stato eseguito su un gruppo di tacchini affetti da *Mycoplasma synoviae*, e il confronto è avvenuto tra tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A) e ossitetraciclina al 20% liquida.

Per quanto riguarda il primo studio, nei primi giorni gli animali manifestavano sintomi respiratori, quali tosse e gonfiore dei seni nasali. È stato inoltre osservato un aumento della mortalità e della formazione di scarti. La diagnosi è stata confermata dalle prove analitiche (SAR positiva sul 100% dei campioni) e dai reperti anatomopatologici. Gli animali di entrambi i gruppi (gruppo tilosina, trattato con tilosina commerciale per 3 giorni con 50 gr/100 litri acqua di abbeverata e gruppo tilvalosina, trattato per 3 giorni con tilvalosina 20 gr/100 litri acqua) hanno manifestato un miglioramento dei sintomi ed una riduzione della mortalità. Tuttavia, a 7 giorni di distanza dal trattamento, il gruppo trattato con tilosina ha avuto necessità di un ulteriore trattamento, mentre il gruppo trattato con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A) non ha richiesto altri trattamenti.

Lo studio di campo realizzato indica quindi una differenza, a favore della tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A), nel trattamento dell'infezione da *Mycoplasma gallisepticum* nei tacchini commerciali.

Nel secondo studio il gruppo in esame era di circa 15000 tacchini commerciali Big 6 allevati su tre capannoni. La prova è stata eseguita trattando un capannone con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A) e gli altri due con ossitetraciclina.

I soggetti all'età di 90 giorni presentavano una leggera forma respiratoria, pallore della testa, con formazione di animali cachettici e conseguenza dimagrimento e morte. Gli animali sono quindi stati trattati: uno dei 3 capannoni con tilvalosina per la durata di 5 giorni e, contemporaneamente, gli altri due con ossitetraciclina, sempre per la durata di 5 giorni, previo accertamento diagnostico eseguito presso un laboratorio privato.

I test eseguiti sono stati PCR , siero-agglutinazione ed ELISA.

L'accertamento ha confermato positività a *Mycoplasma synoviae* e quindi abbiamo proseguito nella terapia specifica.

A distanza di 15 giorni dal trattamento sia i capannoni trattati con ossitetraciclina che con tilvalosina, non hanno presentato ricadute e il gruppo è potuto andare al macello con una percentuale minima di soggetti sottopeso o scarti.

INTRODUZIONE

Il primo studio in oggetto è stato realizzato in un allevamento di 38.000 tacchini maschi; la prova eseguita prevedeva il trattamento degli animali con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A.) oppure con tilosina, ai fini di compararne l'efficacia. Nel secondo studio realizzato, gli animali sono stati trattati con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A.) oppure con ossitetraciclina, ai fini di compararne l'efficacia.

ANAMNESI

L'azienda in oggetto è costituita da 7 capannoni, delle dimensioni di circa 1.400 mq ad aria naturale, con ventilazione interna, mangiatoie *Ska* e abbeveratoi *Plasson*.

Gli animali allevati erano maschi, di razza BUT 6, allevati in numero di 3,6/mq.

Nel primo gruppo, fino al giorno 70, gli animali presentavano un andamento regolare, con mortalità del 2,5% circa. Successivamente, i tacchini contraevano un'infezione di campo da *Mycoplasma gallisepticum*, che portava gli animali a manifestare sintomi respiratori quali tosse, lieve ingrossamento e gonfiore dei seni nasali, mortalità e formazione di scarti.

Nel secondo gruppo, colpito da *Mycoplasma synoviae*, i soggetti all'età di 90 giorni presentavano una leggera forma respiratoria, pallore della testa, con formazione di animali cachettici e conseguenza dimagrimento e morte.

DIAGNOSI

Oltre ai segni clinici, per la conferma della diagnosi, il primo gruppo è stato sottoposto a test diagnostici, presso l' IZS di Forlì, e presso un'altra struttura privata, dando i seguenti risultati:

- SAR positiva sul 100% dei prelievi effettuati, ovvero 70 campioni (10 per ognuno dei 7 capannoni considerati)
- ELISA (Kit IDEXX): titoli che oscillavano da 600 a 1.200.

Sono stati inoltre effettuati tamponi tracheo-nasali per test PCR: questi ultimi davano risultati negativi. Tutti i test sono stati ripetuti 2 volte.

Per quanto riguarda il secondo gruppo, realizzare la diagnosi di MS nel tacchino è alquanto difficile perché esiste sempre il dubbio che una grave infezione da *Stafilococcus aureus* possa interferire sulla diagnosi sierologica, ma l'ausilio della PCR e la positività ematica con ELISA riducono il dubbio della diagnosi. Inoltre sono stati eseguiti dei tamponi dal liquido articolare dando la negatività batteriologica per lo stafilococco.

SEGNI CLINICI E REPERTI ANATOMOPATOLOGICI

Nel primo gruppo, durante la necropsia, sono state osservate lesioni fibrinose a livello dei sacchi aerei toracici, e polmonite emorragica. È stata inoltre rilevata ipertrofia splenica, associata in alcuni casi a forme aspergillari a livello dei polmoni, probabilmente legate alle condizioni climatiche (temperature estive elevate).

Anche il quadro anatomopatologico dava quindi una certezza quasi assoluta di un'infezione da *Mycoplasma gallisepticum*.

Nel secondo gruppo, i soggetti sui quali è stata eseguita la necropsia non presentavano lesioni

anatomopatologiche patognomiche se non in due soggetti dove si è rilevata la presenza di liquido biancastro filamentoso a livello delle articolazioni tibiotarsiche.

TERAPIA:

In base ai dati clinici ed analitici riscontrati, è stato deciso di utilizzare i 2 prodotti; la tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A.), è stata somministrata a 10.000 tacchini (2 capannoni) mentre gli altri soggetti (circa 24.000) sono stati trattati con tilosina.

Studio 1

Gruppo trattato con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A.)

Dosaggio: 20 gr/100 litri d'acqua per 3 giorni

Gruppo trattato con tilosina

Dosaggio: 50 gr/100 litri d'acqua di bevanda , per 3 giorni.

Studio 2

Gruppo trattato con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A.)

Dosaggio: 15 mg/kg per 5 giorni

Gruppo trattato con ossitetraciclina

Dosaggio: 50 mg/kg per 5 giorni

EVOLUZIONE

Studio 1 (*Mycoplasma gallisepticum*)

Durante i 3 giorni di trattamento, sono stati notati miglioramenti clinici, riferibili a quanto segue: i sintomi legati alla tosse e alla sinusite sono diminuiti nettamente. Gli animali di entrambi i gruppi hanno inoltre ripreso a consumare mangime.

La mortalità è notevolmente diminuita nei 2 gruppi presi in esame.

A circa 7 giorni dal trattamento, il gruppo trattato con tilosina mostrava una ricaduta (forma respiratoria), ed una mortalità elevata, rendendo necessario il trattamento con altri farmaci specifici.

Diversamente, il gruppo trattato con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A), rispondeva bene anche 10 giorni dopo il trattamento, e non ha richiesto altri trattamenti.

Studio 2 (*Mycoplasma synoviae*)

Per quanto riguarda *Mycoplasma synoviae* i gruppi dello studio hanno avuto un ottimo risultato.

Relativamente alla terapia, sia con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A), che con ossitetraciclina, è da notare che sia nell'uno che negli altri due non vi sono state ricadute. A tale proposito AIVLOSIN[®] ha risposto bene perché si è comportato in base ai parametri che venivano dettati dalla Casa Farmaceutica. Il dosaggio è stato inferiore a quello usato per il trattamento usato per MG infatti sono stati usati 15 mg /kg.

CONCLUSIONI

Studio 1

Entrambi i gruppi (gruppo tilvalosina- AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A e gruppo tilosina) hanno mostrato un'ottima risposta clinica, con riduzione della mortalità degli animali.

Nel gruppo trattato con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A) si è potuta inoltre osservare una notevole diminuzione della sintomatologia clinica rispetto all'altro gruppo.

Per gli animali appartenenti ai capannoni trattati con tilosina, è stato necessario un ulteriore trattamento con doxiciclina 10-12 giorni dopo il primo trattamento effettuato, mentre per il gruppo trattato con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A) non è stato necessario.

L'azienda ha chiuso il ciclo con il 13,5% di mortalità ed un ICA pari a 2,68.

Questi parametri dipendono da un picco di mortalità osservato nella fase terminale (8-10% di mortalità osservata tra il giorno 100 ed il giorno 140), dovuto ad una ricaduta del gruppo trattato con tilosina, che ha spostato l'indice di conversione.

Studio 2

Per quanto riguarda *Mycoplasma synoviae* i gruppi hanno avuto un ottimo risultato per quanto riguarda la terapia sia con tilvalosina (AIVLOSIN[®], Esteve S.p.A) che con ossitetraciclina, ed è da notare che sia nell'uno che negli altri due non vi sono state ricadute. A tale proposito il prodotto sotto studio ha risposto bene perché si è comportato con quei parametri che venivano dettati dalla Casa Farmaceutica. Il dosaggio è stato inferiore a quello usato per il trattamento usato per MG infatti sono stati usati 15 mg /kg.

Le performance produttive hanno comunque dato dei buoni risultati zoeconomici, con un ICA attorno a 2,55 peso medio 18,5 kg e una mortalità dell'8,92%

INFEZIONE SPERIMENTALE DI TACCHINOTTI CON DIVERSI ASTROVIRUS AVIARI: RISULTATI PRELIMINARI

Toffan A.¹, Catania S.², De Battisti C.¹, Salviato A.¹ & G. Cattoli¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, OIE/FAO and National Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease, OIE Collaborating Centre for Epidemiology Training and Control of Emerging Avian Diseases, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy.*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, (PD), Italy.*

ABSTRACT - Experimental infection of poults with distinct avian astroviruses: preliminary results

In this study we infected 4 groups of 6 turkeys with two TAsTV2 and two GFAsTVs originated from turkey and guinea fowl suffering from enteric disease. Birds were observed daily for the presence of clinical signs. Cloacal swabs were collected at 2, 4, 7, 11, 15, 21, 25, 28 days post infection and tested by RT-PCR for the evaluation of the viral shedding. On day 0, 7 and 14 and 28 post infection cloacal swabs were collected for bacteriological examination. On day 4 post infection 2 birds per group were sacrificed randomly in order to test the lymphoid tissues by RT-PCR.

All infected groups of poults showed clinical signs such as ruffled feathers, depression and diarrhoea. Astroviruses were detected by RT-PCR in infected turkeys from day 2 until day 25 post infection depending on the challenge strain. Astroviruses were detected in all lymphoid organs of all infected groups.

The results indicate that it was possible to reproduce in poults the clinical picture observed after natural exposure to TAsTV2. Interestingly, astroviruses were shed for longer period of time compared to the presence of evident signs of disease. Furthermore, the data obtained show that GFAsTV could infect poults and cause disease in this species.

Introduzione

Gli astrovirus sono virus a RNA sprovvisti di envelope di dimensioni comprese tra 28-30 nm, appartenenti alla famiglia *Astroviridae*. Il nome deriva dal loro tipico aspetto "stellato" visibile al microscopio elettronico in colorazione negativa. Questi virus colpiscono i giovani individui di molte specie, uomo compreso, dove causano episodi di malattia enterica di lieve e media gravità, generalmente autolimitanti. Negli avicoli però sono stati descritti episodi anche gravi di malattia con grave risentimento generale e aumento della mortalità (1). Astrovirus sono stati osservati anche in organi linfoidi (timo e borsa di Fabrizio) facendo supporre un'attività immunosoppressiva (2). Tra le specie avicole, la più colpita è senza dubbio il tacchino (3, 4), anche se astrovirus a livello intestinale sono stati segnalati con una certa frequenza anche in polli, anatre e recentemente anche in faraone (5).

Materiali e Metodi

Nel presente studio 4 gruppi di 6 tacchinotti di 6-7 giorni di età sono stati infettati con diversi ceppi di astrovirus, in particolare sono stati utilizzati 2 ceppi di Turkey Astrovirus tipo 2 (TAsTV-2) e 2 ceppi di Guinea Fowl Astrovirus (GFAsTV) isolati in Italia da

animali che presentavano sintomi enterici. Un gruppo di 6 tacchinotti della stessa età è stato utilizzato come gruppo di controllo negativo.

I soggetti infettati sono stati osservati quotidianamente per rilevare la presenza di segni clinici; inoltre in giorni prestabiliti (2, 4, 7, 11, 15, 21, 25, 28) ogni soggetto è stato pesato e sottoposto a prelievo di tampone cloacale. Al 4° giorno post infezione 2 soggetti per gruppo, scelti in modo casuale, sono stati sacrificati per il prelievo degli organi linfoidi (timo, milza e borsa di Fabrizio). Tutti i campioni prelevati sono stati analizzati tramite RT-PCR (4). Al giorno 0, 7, 14, e 28 p.i. sono stati effettuati anche tamponi cloacali per esame batteriologico allo scopo di escludere la presenza di batteri patogeni.

Risultati e Conclusioni

I tacchinotti sperimentalmente infettati hanno manifestato segni clinici di malattia quali: piumaggio arruffato, depressione e diarrea per un periodo variabile da 1 a 7 giorni. L'eliminazione virale è stata rilevata tramite RT-PCR a partire dal 2° giorno p.i. fino anche al 25° giorno p.i. a seconda del ceppo in analisi. La presenza del virus di challenge è stata confermata con la RT-PCR anche negli organi linfoidi di tutti i gruppi facendo supporre un tropismo di questi virus per i tessuti linfatici. Gli animali del gruppo di controllo non hanno mostrato segni clinici di malattia per tutta la durata dell'esperimento e i tamponi cloacali hanno sempre dato esito negativo per astrovirus mediante RT-PCR. I risultati ottenuti nel presente lavoro confermano che è possibile riprodurre sperimentalmente i sintomi clinici osservabili in campo in seguito ad infezione con astrovirus, inoltre forniscono importanti dati sullo shedding virale che è risultato essere prolungato nel tempo, molto oltre la scomparsa dei sintomi clinici (6, 7). Per la prima volta è stata dimostrata inoltre la capacità di GFAsT di infettare e causare malattia nel tacchino.

Bibliografia

1. Reynolds DL, Schultz-Cherry SL (2003) Astrovirus infections. In: Saif YM (ed) *Diseases of Poultry 11th Edition*. Blackwell, Ames, IA, pp 320-326
2. Da Silva S.E.L., Bonetti A.M., Petrocelli A.T.M., Ferrari H.F., Luvizzotto M.C.R. & T.C. Cardoso. Detection of turkey astrovirus in young poultts affected with poult enteritis complex in Brazil. *The Journal of Veterinary Medical Sciences*, 2008, 70, pp 629-631
3. Canelli E., Titarelli C., Barbieri I., Ceruti R., Pennelli D. & A. Lavazza. Identificazione e caratterizzazione genetica di astrovirus aviari. *Proceeding of XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, Parma, 30/09/2009, pp 29-30
4. Cattoli G., De Battisti C., Toffan A., Salviato A., Lavazza A., Cerioli M. & I. Capua. Co-circulation of distinct genetic lineages of astroviruses in turkeys and guinea fowl. *Archive of Virology*, 2007, 152, pp595-602
5. Cattoli G., Toffan A., De Battisti C., Salviato A., Terregino C. & I. Capua. Astroviruses found in the intestinal contents of guinea fowl suffering from enteritis. *Veterinary Record*, 2005 Feb 12, 156, pp 220
6. Tang Y., Murgia M.V., Ward L. & Y.M. Saif. Pathogenicity of turkey astrovirus in turkey embryos and poultts. *Avian Diseases*, 2006, 50, pp526-531
7. Paintin-Jackwook M.J., Spackman E. & M. Day. Pathogenesis of type 2 turkey astrovirus with variant capsid genes in 2-day-old specific pathogen free poultts. *Avian Pathology*, 2008, 37, pp 193-201

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DI VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE ISOLATI IN ITALIA NEL PERIODO 2007-2009 E NEL PRIMO BIMESTRE DEL 2010

Tosi G.¹, Taddei R. ¹, Barbieri I. ², Fiorentini L. ¹, Massi P. ¹

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

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Reparto di Genomica – Sede di Brescia.*

Riassunto

Sono stati caratterizzati (mediante RT-PCR e/o sequenziamento) 368 ceppi di virus della bronchite infettiva aviare (IBV) rilevati in Italia nel triennio 2007-2009 e 40 ceppi di IBV rilevati nei primi due mesi del 2010. Nel corso del periodo considerato e, in particolare, all'inizio del 2010 la circolazione dei differenti genotipi di IBV sembra essersi diversificata. La prevalenza del ceppo 793B sembra infatti in diminuzione, mentre la circolazione dei genotipi QX e IT-02 appare in aumento. Si segnala inoltre la recente ricomparsa, sia pure in forma sporadica, dei genotipi D274 e B1648.

Abstract

A molecular survey of IBV strains detected in Italy during the period 2007-2009 (and during the first two months of 2010) was performed. Serotype 793B is still the most prevalent IBV strain affected the Italian poultry industry. However, an increase of the prevalence of QX strain and IT-02 strain was observed, especially during the beginning of this year. In addition, other IBV strains (D274 and B1648) reappeared in Italy.

Introduzione

La bronchite infettiva aviare è sostenuta da un virus (IBV) appartenente alla Famiglia *Coronaviridae* e al genere *Coronavirus*. Si tratta di una patologia largamente diffusa e responsabile di elevate perdite economiche nell'allevamento intensivo del pollo. Le problematiche legate al controllo della malattia sono causate soprattutto dalla notevole variabilità antigenica dei ceppi di IBV presenti nel territorio e alla periodica comparsa di nuovi sierotipi, genotipi e patotipi. L'identificazione dei ceppi di IBV è perciò importante per poter predisporre adeguati programmi vaccinali. Per questo motivo è stata condotta una caratterizzazione molecolare dei ceppi di IBV evidenziati mediante RT-PCR da materiale diagnostico conferito presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì. I dati raccolti si riferiscono al periodo 2007-2009 e al primo bimestre del 2010.

Materiali e Metodi

Per lo studio sono stati utilizzati i dati relativi al materiale diagnostico (animali vivi con segni clinici, animali deceduti, visceri, tamponi tracheali) che, sulla base dei dati anamnestici e clinici riportati dal veterinario aziendale e delle lesioni anatomo-patologiche osservate in sede necroscopica, erano riconducibili ad un sospetto di infezione da virus della bronchite infettiva aviare (IB). Oltre all'esecuzione di approfondimenti diagnostici per escludere la presenza di altri agenti infettivi, su campioni di organo prelevati in sede autoptica (oppure direttamente dai tamponi

tracheali prelevati in allevamento) veniva condotta la ricerca del virus IBV mediante RT-PCR: L'RNA totale veniva estratto utilizzando il kit di estrazione RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornita dalla ditta produttrice. Una prima RT-PCR di screening per la ricerca di IBV veniva allestita utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®) e primer specifici per una porzione di 383 bp del gene S (4). In particolare, in 25µl totali venivano miscelate le seguenti componenti: 600nM di ogni primer (XCE1+, XCE3-), 5µl di 5X Onestep RT-PCR Buffer, 0.4nM di ogni dNTP, 12.5U di inibitori delle Rnasi, 1µl di OneStep RT-PCR enzyme mix e 5µl di estratto di RNA. Profilo di amplificazione: 1 X (50°C, 30 min), 1 X (94°C, 15 min), 40 X (94°C, 30 sec; 55°C, 30sec, 72°C, 40 sec), 1 X (72°C, 10 min).

In caso di positività, il prodotto di amplificazione veniva sottoposto ad una PCR duplex emi-nested (kit AccuPrime™ Taq DNA polymerase System, Invitrogen®) utilizzando lo stesso primer reverse impiegato nella prima PCR (XCE3-) e due differenti primer forward, BCE1+ e MCE1+, specifici per il sierotipo 793/B e M41 rispettivamente (4). In 25µl totali venivano miscelate le seguenti componenti: 200nM di ognuno dei 3 primer, 2,5 µl di 10x AccuPrime™ PCR Buffer II, 1 µl di AccuPrime™ Taq DNA polymerase e 2 µl di DNA amplificato. Profilo di amplificazione: 1 X (94°C, 2 min), 35 X (94°C, 30 sec; 55°C, 30sec, 68°C, 1 min), 1 X (68°C, 7 min).

Nei casi in cui la seconda PCR risultava negativa, l'amplificato ottenuto dalla prima RT-PCR di screening veniva sottoposto a sequenziamento. Le reazioni di sequenza venivano approntate a partire dal prodotto PCR previa purificazione su gel (Qiaquick Gel extraction kit – QIAGEN®) con il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem®) secondo le istruzioni del produttore, impiegando la stessa coppia di primers utilizzata nell'amplificazione (XCE1+, XCE3-). Le reazioni di sequenza venivano sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga 3130 (Applied Biosystems®). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v7.0 (DNASTAR Inc., Madison®, WI, USA). Tutti i ceppi di IBV evidenziati mediante RT-PCR nel 2010 sono stati sottoposti direttamente a sequenziamento.

Dato che la caratterizzazione molecolare non è in grado di differenziare i ceppi di campo dai ceppi vaccinali vivi attenuati, per l'elaborazione dei dati si è deciso di utilizzare solo i casi che rispondevano ai seguenti criteri: presenza di dati anamnestici, segni clinici e lesioni anatomo-patologiche riferibili ad un sospetto di IB, esclusione di altri agenti infettivi di tipo respiratorio, impiego di ceppi vaccinali diversi rispetto al ceppo di IBV evidenziato a livello molecolare oppure gruppi vaccinati da almeno tre settimane nei confronti del ceppo di IBV riscontrato. Quest'ultimo parametro è stato ricavato dai dati disponibili in letteratura sulla capacità della metodica RT-PCR di rilevare il virus IBV dalla trachea (6).

E' stata infine condotta un'elaborazione più dettagliata dei casi riferibili al genotipo QX, in quanto di più recente comparsa nel nostro paese.

Risultati

Sono stati considerati (nel triennio 2007-2009) 368 casi di infezione da IBV, a cui si aggiungono 40 casi rilevati nel primo bimestre del 2010. Circa la metà (50,3% nel triennio, 57,5% nel 2010) provenivano da gruppi allevati in Emilia Romagna. L'analisi dettagliata dei dati raccolti è riportata nelle tabelle (da tabella 1 a tabella 11).

Discussione

Lo scopo dell'indagine consisteva nel fornire un quadro della situazione epidemiologica dell'infezione da IBV negli ultimi anni, con particolare riguardo all'evoluzione dei genotipi di IBV presenti sul territorio. Trattandosi di materiale diagnostico conferito presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì, i dati raccolti si riferiscono prevalentemente alla situazione dei gruppi allevati in Romagna. Non mancano tuttavia spunti di riflessione anche nei confronti di altre regioni del nostro paese. Sia pure con qualche oscillazione, i casi di infezione da IBV si sono verificati con una certa regolarità nel triennio considerato, con aumenti di prevalenza nel periodo invernale (come evidenziato dai 40 casi riscontrati nei primi due mesi di quest'anno). Va ricordato che i casi studiati non sono frutto di un campionamento sistematico, ma del conferimento volontario di materiale diagnostico presso il laboratorio da parte dei veterinari aziendali. Per questo motivo non è possibile, sulla base dei dati raccolti, una valutazione precisa della prevalenza dell'infezione nel territorio.

Le positività da genotipo 793B si mantengono su valori elevati (sia pure in flessione, a partire dal 2008, come % sul totale dei genotipi evidenziati). I casi osservati hanno riguardato prevalentemente il pollo da carne e sono stati caratterizzati soprattutto da sindromi respiratorie comparse dopo i 40 giorni di età. Com'è noto la profilassi immunizzante (con vaccini vivi attenuati) nei confronti del sierotipo 793B è largamente diffusa in tutte le tipologie produttive. La caratterizzazione molecolare impiegata in questo studio non è in grado di differenziare i ceppi di campo da quelli vaccinali. Per questo motivo i casi considerati nell'indagine sono stati selezionati su base clinico-anamnestica (come descritto nel paragrafo "materiali e metodi") per ridurre al minimo il rischio di rilevare ceppi vaccinali di IBV.

Analogamente a quanto rilevato in altri studi (8) la circolazione del genotipo M41 appare in calo in questi ultimi anni (anche se un lieve incremento è stato osservato a partire dal 2008). A differenza del genotipo 793B la sua diffusione appare distribuita in maniera regolare tra le differenti tipologie produttive.

Dopo essersi attestato al 16,5% nel 2007 (sul totale dei genotipi osservati) il genotipo IT-02 ha subito una flessione nei due anni seguenti. La sua diffusione appare tuttavia in ripresa nei primi mesi dell'anno in corso. La presenza di questo genotipo è stata rilevata prevalentemente nel pollo da carne, associata a sindromi respiratorie e a problemi di difformità nei gruppi colpiti. A differenza del genotipo 793B la diffusione del genotipo IT-02 appare distribuita in modo regolare durante tutto il ciclo produttivo del broiler.

Segnalato in Europa a partire dal 2002 (3) e in Italia a partire dal 2005 (2), il genotipo QX si è ormai diffuso in tutte le tipologie produttive. Sulla base dei dati raccolti nello studio la presenza del genotipo QX è stata riscontrata in 11 regioni italiane. Come evidenziato dalle tabelle 7,8, 9 e 10, accanto alle tipiche forme nefropatogene il genotipo QX appare coinvolto anche in sindromi respiratorie senza interessamento renale. Il tropismo dei ceppi QX per l'epitelio della mucosa respiratoria è del resto già stato dimostrato sperimentalmente (1). E' da segnalare il riscontro del genotipo QX in un gruppo di galline ovaiole da consumo colpite, a 19 settimane di età, da una sindrome respiratoria. A partire dalle 22 settimane di età il gruppo ha cominciato a presentare quadri anatomo-patologici riferibili alla cosiddetta "sindrome delle false ovaiole" che alcuni lavori scientifici mettono in relazione proprio all'infezione da ceppi QX o "QX-like", ma in una fase precoce del ciclo di sviluppo (7). Sono inoltre da segnalare due casi di infezione da genotipo QX in gruppi di fagiani (*Phasianus colchicus*) con interessamento renale o respiratorio/renale.

Nel fagiano è stata inoltre evidenziata la presenza dei genotipi 793B (7 casi) e M41 (2 casi) in corso di forme respiratorie e in gruppi non vaccinati nei confronti del virus IBV. Nel 2007 è stata inoltre rilevata la presenza del genotipo 793B in un gruppo di galline faraone (*Numida meleagris*) colpite da una sindrome respiratoria e non vaccinate nei confronti del virus IBV. Il gruppo colpito non presentava connessioni epidemiologiche con allevamenti di polli. In letteratura sono riportati rari casi di isolamento e di riproduzione sperimentale dell'infezione da IBV in questa specie (5).

Va sottolineata, tra la fine del 2009 e l'inizio del 2010, la ricomparsa sul territorio nazionale della cosiddetta "variante olandese" D274. I casi osservati riguardano due gruppi di polli da carne (di 25 e 52 giorni di età rispettivamente) e un allevamento di pollastre da riproduzione di 60 giorni di età. Tutti i gruppi osservati presentavano una sindrome di tipo respiratorio e non erano vaccinati nei confronti del genotipo D274.

Si riporta infine un caso di genotipo B1648, all'inizio del 2010, in un gruppo di polli colorati colpiti, attorno ai 90 giorni di età, da una sindrome respiratoria.

Sulla base dei dati raccolti nei primi due mesi del 2010 (e che pertanto andranno valutati su un periodo più ampio) la prevalenza dei genotipi di IBV nel territorio appare diversificata. Accanto ad una diminuzione della diffusione del sierotipo 793B si assiste ad un incremento dei genotipi QX e IT-02 e alla sia pur sporadica ricomparsa dei ceppi D274 e B1648.

Bibliografia

1. Abd El Rahman S., El-Kenawy A.A., Neumann U., Herrler G, Winter C., 2009. Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 38:41-45.
2. Beato M.S., De Battisti C., Terregino C., Drago A., Capua I., Ortali G., 2005. Evidence of circulation of a chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *The Veterinary Record* 156:720.
3. Bochkov Y.A., Batchenko G.V., Scherbakova L.O., Borisov A.V., Drygin V.V., 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathology* 35:379-393.
4. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J., 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 28:593-605.
5. Ito N.M.K., Miyaji C.I., Capellaro C.E.M., 1991. Studies on broiler's IBV and IB-like virus from guinea fowl. *Proceedings of the II international symposium on infectious bronchitis*, Giessen, 302-307.
6. Jackwood M.W., Yousef N.M.H., Hilt D.A., 1997. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 41:105-110.
7. Landman W.J.M., Dwars R.M., De Wit J.J., 2005. High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection. *Proceedings of the 14th world veterinary poultry congress*, 22-26 august 2005, pag.369.
8. Moreno A., Fallacara F., Tosi G., Massi P., 2007. Caratterizzazione molecolare di ceppi di virus della bronchite infettiva aviaria isolati in Italia tra il 2005 e il 2007. *Atti del workshop di virologia veterinaria*, 7-8 giugno 2007, Bologna, pag.55.

Tabella 1. Distribuzione geografica dei ceppi di IBV.

REGIONE	2007	2008	2009	2010
Abruzzo	4	4	0	0
Basilicata	0	1	2	0
Calabria	0	0	9	1
Campania	1	3	5	3
Emilia Romagna	64	49	67	23
Friuli Venezia Giulia	4	2	0	1
Lazio	7	4	9	2
Lombardia	4	3	4	2
Marche	27	13	22	7
Molise	5	2	0	0
Piemonte	2	5	1	0
Sicilia	2	3	4	0
Toscana	4	4	7	0
Umbria	0	1	5	1
Veneto	3	3	10	0
TOTALE	127	97	145	40

Tabella 2. Distribuzione temporale dei genotipi di IBV (periodo 2007-2009).

	2007	%sul totale	2008	%sul totale	2009	%sul totale	2010	% sul totale
793B	79	62,2	65	71,1	98	67,6	19	47,5
M41	8	6,3	11	11,3	21	14,5	3	7,5
QX	19	15,0	13	13,4	17	11,7	10	25,0
IT-02	21	16,5	8	4,2	7	4,8	6	15,0
D274	0	0,0	0	0,0	2	1,4	1	2,5
B1648	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,5
TOTALE	127		97		145		40	

Tabella 3. Distribuzione dei genotipi 793B e M41 di IBV in funzione della tipologia produttiva (periodo 2007-2009).

	793B			M41		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
Broilers	39	27	45	2	3	5
Pollastre	6	7	9	3	1	1
Ovaiole da consumo	15	12	19	1	2	1
Riproduttori	4	8	8	0	0	5
Svezinatori	0	2	0	0	2	1
Polli colorati	6	7	13	0	2	5
Galletti	1	1	3	0	0	3
Capponi	1	0	0	0	1	0
Fagiani	6	1	0	2	0	0
Faraone	1	0	0	0	0	0

Tabella 4. Distribuzione dei genotipi QX, IT-02 e D274 di IBV in funzione della tipologia produttiva (periodo 2007-2009).

	QX			IT-02			D274		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009	2007	2008	2009
Broilers	8	4	6	14	4	7	0	0	2
Pollastre	1	3	1	3	1	0	0	0	0
Ovaiole da consumo	3	1	4	1	1	0	0	0	0
Riproduttori	1	0	2	0	0	0	0	0	0
Svezinatori	0	4	0	2	0	0	0	0	0
Polli colorati	4	1	3	0	1	0	0	0	0
Galletti	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Capponi	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fagiani	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Faraone	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 5. Distribuzione % dei genotipi di IBV nel broiler (periodo 2007-2009).

Genotipo	2007	2008	2009
793B	61,9	71,1	71,0
M41	3,2	7,9	7,3
QX	12,7	10,5	8,7
IT-02	22,2	10,5	10,1
D274	0,0	0,0	2,9

Tabella 6. Distribuzione % dei genotipi di IBV nelle pollastre (periodo 2007-2009).

Genotipo	2007	2008	2009
793B	46,1	58,3	81,8
M41	23,1	8,4	9,1
QX	7,7	25,0	9,1
IT-02	23,1	8,3	0,0
D274	0,0	0,0	0,0

Tabella 7. Distribuzione % dei genotipi di IBV nelle galline ovaiole da consumo (periodo 2007-2009).

Genotipo	2007	2008	2009
793B	75,0	75,0	79,2
M41	5,0	12,5	4,2
QX	15,0	6,3	16,6
IT-02	5,0	6,2	0,0
D274	0,0	0,0	0,0

Tabella 8. casi di infezione da genotipo QX nel 2007.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Abruzzo	Broilers	Respiratorio+renale
Basilicata	Polli colorati	Respiratorio
Campania	Polli colorati	Renale
Emilia Romagna	Broilers	Renale
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Riproduttori	Respiratorio
Emilia Romagna	Fagiani	Respiratorio+renale
Emilia Romagna	Capponi	Respiratorio
Lazio	Polli colorati	Respiratorio
Lazio	Polli colorati	Respiratorio
Marche	Broilers	Respiratorio
Marche	Broilers	Respiratorio
Marche	Broilers	Renale
Marche	Broilers	Renale

Tabella 9. Casi di infezione da genotipo QX nel 2008.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Abruzzo	Svezzatore	Respiratorio
Abruzzo	Svezzatore	Renale
Abruzzo	Svezzatore	Difformità di sviluppo
Basilicata	Polli colorati	Respiratorio
Campania	Svezzatore	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Pollastre	Respiratorio
Lombardia	Broilers	Respiratorio+renale
Piemonte	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Sicilia	Broilers	Renale

Tabella 10. casi di infezione da genotipo QX nel 2009.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Calabria	Polli colorati	Respiratorio
Campania	Polli colorati	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Respiratorio
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Emilia Romagna	Fagiani	Renale
Emilia Romagna	Polli colorati	Respiratorio
Lombardia	Broilers	Renale
Marche	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Marche	Galline ovaiole da consumo	Apparato riproduttore
Marche	Riproduttori	Respiratorio
Marche	Riproduttori	Respiratorio
Piemonte	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio
Veneto	Broilers	Respiratorio

Tabella 11. Casi di infezione da genotipo QX nel 2010.

Regione	Tipologia produttiva	Tropismo del virus IBV
Campania	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio + Apparato riproduttore
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio
Emilia Romagna	Pollastre	Renale
Emilia Romagna	Broilers	Respiratorio + renale
Emilia Romagna	Galline ovaiole da consumo	Respiratorio + Apparato riproduttore ("false ovaiole")
Emilia Romagna	Riproduttori	Apparato riproduttore
Emilia Romagna	Polli colorati	Respiratorio + renale
Marche	Polli colorati	Respiratorio+renale
Umbria	Riproduttori	Respiratorio

Elementare... da Elanco! un modo nuovo, facile e sicuro per il controllo del pidocchio rosso



• Nuovo

Meccanismo d'azione unico

Nessuna resistenza in vivo

Uova: nessun tempo di sospensione

• Sicuro

Utilizzabile in presenza di animali

Singola applicazione

• Persistente

Lunga durata d'azione

Elanco Animal Health

Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A. Via Gramsci, 731

50019 Sesto Fiorentino (Fi) - Tel. 055 4257.031 - Fax 055 4257.068

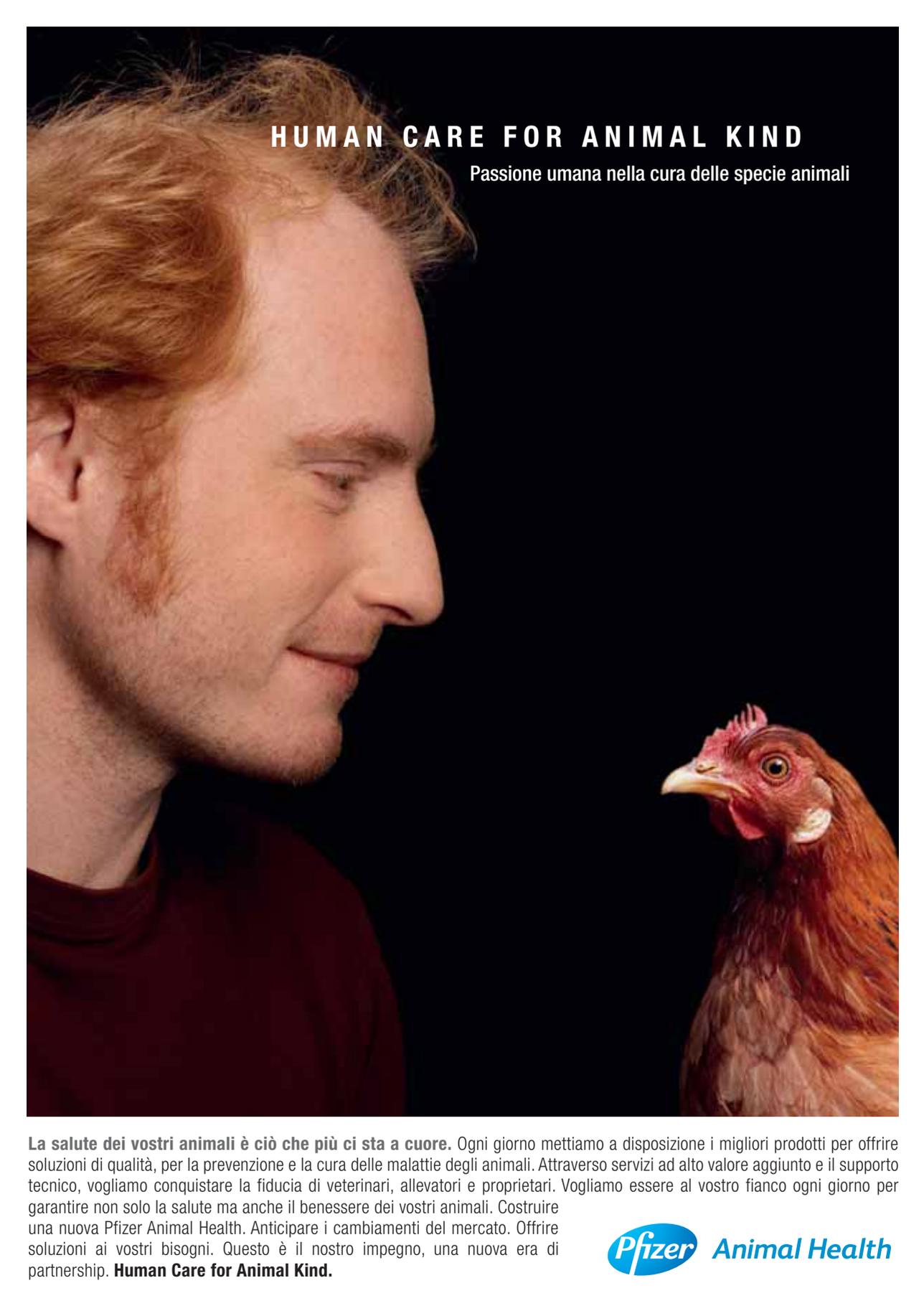
www.elanco.com

**Contatta
Elanco**

Elanco

Soluzioni fidate.

INDICE DEGLI AUTORI

A close-up profile of a man with reddish-brown hair, looking towards a brown chicken. The background is dark, making the subjects stand out.

HUMAN CARE FOR ANIMAL KIND

Passione umana nella cura delle specie animali

La salute dei vostri animali è ciò che più ci sta a cuore. Ogni giorno mettiamo a disposizione i migliori prodotti per offrire soluzioni di qualità, per la prevenzione e la cura delle malattie degli animali. Attraverso servizi ad alto valore aggiunto e il supporto tecnico, vogliamo conquistare la fiducia di veterinari, allevatori e proprietari. Vogliamo essere al vostro fianco ogni giorno per garantire non solo la salute ma anche il benessere dei vostri animali. Costruire una nuova Pfizer Animal Health. Anticipare i cambiamenti del mercato. Offrire soluzioni ai vostri bisogni. Questo è il nostro impegno, una nuova era di partnership. **Human Care for Animal Kind.**

 **Animal Health**

Agnoletti F., 67, 73, 81
 Bacchin C., 73
 Bano L., 67, 73, 81
 Barbieri I., 181, 199, 217
 Bertrand H., 86
 Bilato D., 121
 Billi L., 89
 Bonci M., 67, 73, 81
 Bonfanti L., 21
 Bonoli A., 97
 Borrelli L., 113
 Bradbury J. M., 115
 Brustolin M., 115

 Calabria M., 113
 Capua I., 205
 Catania S., 115, 117, 121, 215
 Catelli E., 161, 177
 Cattoli G., 205, 215
 Cecchinato M., 177
 Ceruti R., 117, 199
 Cesca A., 81
 Cibir V., 55
 Cordioli P., 199
 Cringoli G., 113

 Dall'Ara A., 89, 97, 167
 Dare C. M., 115
 De Battisti C., 205, 215
 De Luca Bossa L., 113
 Dipineto L., 113
 Drigo I., 67, 73, 81

 Ferri G., 41
 Ferro T., 81
 Fiorentini L., 123, 133, 181,
 187, 195, 217
 Fioretti A., 113
 Fossati P., 13

 Gagliardi S., 97
 Gallazzi D., 17
 Gargiulo A., 113
 Giacomelli M., 151
 Giovanardi D., 67, 161
 Gobbo F., 115, 121
 Golfari G., 89, 97, 167
 Grilli G., 17

 Iob L., 117, 121

 Lupini C., 161, 177

 Macri A., 61
 Marciano S., 205
 Marcon B., 73
 Massi P., 89, 97, 123, 133,
 167, 181, 187, 195, 217
 Menandro M.L., 151
 Menna L.F., 113
 Mingardo M., 117
 Mirabile M., 113
 Morandini E., 67, 161, 199
 Moreno A., 199

 Nicholas R.A.J., 121
 Nonni S., 97

 Ortali G., 117, 161

 Pasotto D., 151
 Pesente P., 161, 177
 Piccirillo A., 151
 Pinoia F., 86
 Pisano S., 113
 Pittman M., 29
 Pizzuto M.S., 205
 Poglayen G., 89, 97, 167

 Qualtieri K., 121

 Ramirez A.S., 115
 Ricchizzi E., 177
 Ricci A., 55
 Rinaldi L., 113
 Rossi A., 211
 Rossi G., 161
 Russo T., 113

 Salviato A., 215
 Sani P., 187
 Santaniello A., 113
 Sensale M., 113
 Sperati Ruffoni L., 177

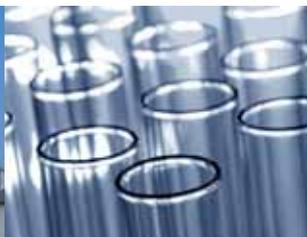
 Taddei R., 123, 133, 181, 187,
 195, 217
 Terregino C., 117
 Toffan A., 215
 Tonon E., 67
 Tosi G., 123, 133, 181, 187,
 195, 217

 Vascellari M., 81

Finito di stampare
nel mese di aprile 2010
da La Ducale Srl - Parma



INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI : ANIMAL HEALTH PRODUCT



> RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.



Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfere da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

**INDUSTRIA ITALIANA
INTEGRATORI TREI S.p.A.**

**AMMINISTRAZIONE
E STABILIMENTO**

ADMIN. AND PRODUCTION PLANT
Via Affarosa 4
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:
+39 0522 640711

FAX:
+39 0522 649757
+39 0522 640716

info@treivet.com
www.treivet.com