



Camera di Commercio
Forlì-Cesena



Bayer HealthCare



www.merial.com



**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 2011



L Convegno Annuale

Forlì, 7-8 Aprile 2011

ATTI del L Convegno Annuale

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

In copertina: **“No te aha oe riri”**, Paul Gauguin, 1896 - olio su tela

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2011**

Forlì, 7-8 Aprile 2011

Indice

Prefazione	pag. 19
------------------	---------

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA

MALATTIE VIRALI EMERGENTI TRASMESSE DAI VETTORI: IL RUOLO DEGLI UCCELLI SELVATICI NELLA LORO DIFFUSIONE E VALUTAZIONE DEL RISCHIO PER L'AVICOLTURA INTENSIVA

Pisa, 12 Novembre 2010

- *Michele Dottori* - Le specie avicole allevate e le arbovirosi trasmesse da culicidi **pag. 23**
- *Paolo Mani* - Il ruolo degli uccelli selvatici nella diffusione di Flavivirus mosquito-borne in Toscana **pag. 33**
- *Rossella Lelli* - Il ruolo del centro di referenza delle malattie esotiche **pag. 41**

ATTI DEL L CONVEGNO ANNUALE

Forlì, 7-8 Aprile 2011

INCONTRO:

SITUAZIONE SANITARIA DELL'AVICOLTURA ITALIANA: FOCUS SULLE PRINCIPALI MALATTIE OSSERVATE DURANTE IL 2010

- *Ana Moreno* - Caratterizzazione molecolare dei ceppi del virus della malattia di Gumboro in Italia **pag. 59**
- *Paola Massi, Giovanni Tosi* - Epidemiologia della bronchite infettiva aviaria **pag. 60**
- *Alessandra Piccirillo* - Malattia di Marek nei riproduttori pesanti: una malattia riemergente del settore avicolo? **pag. 61**
- *Salvatore Catania* - Micoplasmi e Micoplasmosi nel settore avicolo **pag. 63**
- *Luca Bano* - Le clostridiosi aviarie: aggiornamenti e nuove sfide **pag. 66**

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- *Bilato D., Gobbo F., Facco D., Brustolin M., Battanolli G., Catania S.*
ISOLAMENTO DI *MYCOPLASMA MELEAGRIDIS* DA UN GRUPPO DI FARAONE (*NUMIDA MELEAGRIS*). **pag. 73**
- *Bonci M., Carminato A., Cesca A., Agnoletti F., Drigo I., Bano L.*
EPISODIO DI DERMATOMIOSITE DA *ASPERGILLUS FUMIGATUS* NEL CAPPONE. **pag. 76**
- *Brustolin M., Battanolli G., Quattieri K., Bilato D., Job L., Catania S.*
IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEI MICOPLASMI AVIARI MEDIANTE DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE). **pag. 79**
- *Caroli A., Pugliese N., Circella E., Pazzani C., Camarda A.*
STABILITÀ DEL GENE *FLAA* IN *CAMPYLOBACTER COLI*. **pag. 83**

- *Casadio M., Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Taddei R., Bolognesi P.G., Catelli E.* - VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI CONTAMINAZIONE BATTERICA IN UOVA ED EMBRIONI DI POLLO PRESSO UN INCUBATOIO INDUSTRIALE. **pag. 87**
- *Catania S., Bilato D., Gobbo F., Brustolin M., Battanolli G., Beato M.S., Job L.* INFEZIONE SPERIMENTALE IN GALLINE OVAIOLE SPF CON DUE DIFFERENTI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* DENOMINATI PASC8 E TRACH: RISULTATI PRELIMINARI. **pag. 92**
- *Catania S., Battanolli G., Brustolin M., Mazzacan E., Quattieri K., Gobbo F., Job L.* - ISOLAMENTO DI UN CEPPO “ESOTICO” DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*, IN UN FENICOTTERO MINORE (*PHOENICONAIAS MINOR*) DI IMPORTAZIONE. CONSIDERAZIONE SU POSSIBILI VIE DI INTRODUZIONE DEI PATOGENI. **pag. 95**
- *Circella E., Pugliese N., Todisco G., Camarda A.* DIAGNOSTICA CLINICA E MOLECOLARE DELLE INFEZIONI DA *CIRCOVIRUS* NEI VOLATILI D’AFFEZIONE. **pag. 98**
- *Circella E., Pennelli D., Tagliabue S., Di Paola G., Camarda A.* GENI DI VIRULENZA IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE IN CORSO DI COLIBACILLOSI. **pag. 104**
- *Conzo G., Dotto G., Cassano D., De Guz D., Piccirillo A.* - ANALISI MOLECOLARE DI CEPPI DEL *CIRCOVIRUS* DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI IN ITALIA. RISULTATI PRELIMINARI. **pag. 111**
- *Dipineto L., Gargiulo A., Sensale M., De Luca Bossa L. M., Russo T.P., Borrelli L., Calabria M., Menna L.F., Fioretti A.* - PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER* TERMOTOLLERANTI E RELATIVI FATTORI DI VIRULENZA IN ALZAVOLE (*ANAS CRECCA*). **pag. 122**
- *Dotto G., Giovanardi D., Giacomelli M., Grilli G., Piccirillo A.* - PRIMA SEGNALEZIONE DELLA PRESENZA DI INTEGRONI DI CLASSE 1 E 2 IN *E. COLI* AVIARI ISOLATI NEL TACCHINO DA CARNE. **pag. 127**
- *Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Gelmetti D., Massi P.* - ENCEFALOMIELITE AVIARE NEL POLLO DA CARNE E NELLA POLLASTRA OSSERVATI NELL’ANNO 2010. **pag. 141**
- *Giacomelli M., Andrighetto C., Lombardi A., Martini M., Piccirillo A.* MONITORAGGIO LONGITUDINALE PER IL RILIEVO DI *CAMPYLOBACTER* TERMOFILI IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI DA CARNE. **pag. 146**
- *Giovanardi D., Morandini E.* - APPROFONDIMENTI DIAGNOSTICI IN ALCUNI CASI CLINICI NELLE SPECIE AVICOLE MINORI. **pag. 160**

- Gobbo F., Brustolin M., Battanolli G., Qualtieri K., Bilato D., Iob L., Catania S. - STUDIO DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) IN ALCUNI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ISOLATI IN ITALIA. pag. 164
- Graziani C., Giufrè M., Accogli M., Argentieri M., Giammanco A., Lettini A., Pecile P., Raglio A., Staffolani M., Massi P., Taddei R., Fiorentini L., Tosi G., Cerquetti M. - CLONI DI *ESCHERICHIA COLI* DI ORIGINE UMANA ED AVIARIA RESISTENTI AI FLUOROCHINOLONI. pag. 168
- Grilli E., Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Taddei R., Tugnoli B., Fantinati P., Piva A. - UNA COMBINAZIONE MICROINCAPSULATA DI ACIDO SORBICO E COMPOSTI NATURALI IDENTICI RIDUCE LA PREVALENZA E LA PRESENZA DI *S. ENTERITIDIS* NEL POLLO DA CARNE. pag. 170
- Lupini C., Cecchinato M., Listorti V., Muñoz O., Terregino C., Cecchettin K., Catelli E. - INTERAZIONE FRA VACCINI VIVI PER LA PROFILASSI DELLA RINOTRACHEITE DEL TACCHINO E DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE SOMMINISTRATI IN ASSOCIAZIONE AD UN GIORNO DI VITA NEL TACCHINO. pag. 174
- Manarolla G., Rampin T., Muccioli F., Sironi G. - MIOPATIA DEGENERATIVA MULTIFOCALE DEL MUSCOLO PETTORALE SUPERFICIALE IN POLLI DA CARNE. pag. 181
- Mercier L., Ranieri L. - UTILIZZO DEGLI OLII ESSENZIALI ED ESTRATTI DI PIANTE PER IL CONTROLLO DELLA *SALMONELLA SPP.*, *E. COLI* E *CAMPYLOBACTER* NELLE PRODUZIONI AVICOLE. pag. 184
- Taddei R., Tosi G., Boniotti B., Barbieri I., Fiorentini L., Massi P. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA: AGGIORNAMENTO SUI DATI RACCOLTI NEL CORSO DELL'ANNO 2010. pag. 189

POSTER

- Pennelli D., Deangeli D., Saggiorato M., Luisetto P., Bostvironnois C. *CLOSTRIDIUM* FIRSTTEST™: UN NUOVO STRUMENTO PER LA IDENTIFICAZIONE RAPIDA IN CAMPO DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN CAMPIONI FECALI DI BROILER. pag. 201

INDICE DEGLI AUTORI pag. 205

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.

 Aviagen

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.

Via Marconi 15
27043 Broni (PV)
Italy

Tel: 0385 569 986
Fax: 0385 52093
officeitaly@aviagen.com

www.aviagen.com

Aviagen™
Italia

**SPECIALITÀ
REGISTRATA**



La soluzione che salva l'uovo e la gallina.

Da Bayer il primo farmaco veterinario autorizzato contro l'acaro rosso.



Bayer HealthCare
Animal Health

Vaccine technology makes life simpler

IN INCUBATOIO

UNA VOLTA PER SEMPRE

CONTRO OGNI VIRUS
IBD CLASSICO

PROTEZIONE
INDIVIDUALE

NESSUNA INTERFERENZA
CON GLI ANTICORPI MATERNI



Costo del mangime !

Il valore dell'efficienza alimentare

I prodotti Cobb ridurranno i costi del mangime attraverso una grande efficienza alimentare con diete a basso contenuto nutrizionale.

Con i prodotti Cobb i costi non vi scappano di mano.



cobb-vantress.com



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

Prevenzione e Terapia

100%

150^o
ANNIVERSARIO
INDUSTRIE FARMACEE
ITALIANE

Made in Italy



FATRO, farmaci e vaccini
studiati, testati e prodotti in Italia



la salute animale per la salute dell'uomo

Food for professionals



HUVEPHARMA®

Add performance to your business



Huvepharma NV - Uitbreidingstraat 80 - 2600 Antwerp - Belgium
Tel.: +32 3 288 1849 - Fax: +32 3 289 7845
e-mail: customerservice@huvepharma.com
Per l'Italia: paolo.schiavi@huvepharma.com
www.huvepharma.com

vaccini per:
Bronchite Infettiva ●
Malattia di Newcastle ●
Mycoplasma ●



vaccini per:
● Salmonellosi
prodotto per:
● Esclusione Competitiva

Innovative Solutions *in Poultry Health*



vaccini per:
● Anemia Infettiva
● Malattia di Marek
● Malattia di Gumboro

vaccini per:
Coccidiosi ●
Enterite Necrotica ●



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

Un ringraziamento va anche alla Fiera di Forlì.

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2011 sono realizzate grazie al contributo di:

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

PREFAZIONE

L'avicoltura, dal dopoguerra ad oggi, ha compiuto passi da gigante per quanto riguarda le *performances* produttive delle varie specie avicole d'allevamento grazie all'impegno, all'intraprendenza e alla ricerca costante e puntigliosa che ha coinvolto l'intera filiera.

Questi ragguardevoli traguardi hanno interessato tutti i Paesi ad avicoltura intensiva, organizzata anche grazie all'attività di persone che hanno dedicato il loro lavoro al miglioramento dello stato di salute degli animali sia in termini di profilassi che di terapia.

A livello nazionale il comparto avicolo è cresciuto anche grazie all'attività di ricerca e di divulgazione scientifica che la Società Italiana di Patologia Aviaria ha profuso nel corso della sua vita fino a raggiungere l'ambito traguardo che quest'anno viene toccato con il 50° Convegno Nazionale. Questo traguardo ci colloca tra le più "antiche" ed efficienti società scientifiche di patologia aviaria mondiali, basti pensare che l'*American Association of Avian Pathologists* (AAAP) è nata solo 4 anni prima di SIPA, oltre che tra quelle maggiormente conosciute nel comparto veterinario nazionale.

Cinquant'anni iniziati con le giornate avicole varesine per poi percorrere un lungo cammino, affiancati alla Fiera Internazionale dell'Avicoltura di Forlì in cui era già stato festeggiato il 25° Convegno.

Per tale motivo, supportati anche dalla necessità di far conoscere meglio l'evoluzione della patologia aviaria nel nostro Paese, abbiamo pensato di dedicare il Convegno Nazionale ai 50 anni di storia della SIPA.

Naturalmente questo compito non è facile visti i cambiamenti, anche repentini, che hanno contraddistinto l'attività della SIPA che ha cercato sempre di aggiornare i propri soci sull'evoluzione della patologia e dell'igiene avicola.

Il gravoso, ma penso piacevole, compito di illustrare questi cambiamenti è toccato a chi ha vissuto veramente in campo, nelle accademie e nei laboratori l'evoluzione delle tecniche d'allevamento, della diagnostica, della profilassi e dell'insegnamento della patologia aviaria senza però dimenticare quelle che saranno le prospettive future di questa branca delle malattie infettive e dell'igiene così importante per il mantenimento ed il miglioramento che contraddistingue l'avicoltura.

A questo punto vorrei fare un ringraziamento a chi da anni ci stimola a continuare in questo percorso e che sono la vera anima della SIPA, cioè i soci, che sono sempre vicini e partecipi alle nostre attività.

Un ringraziamento va a chi, da anni, ci è stato di supporto nell'organizzazione dei convegni, cioè la CCIAA di Forlì e Cesena, nonché la Fiera di Forlì che hanno condiviso con noi buona parte della nostra storia. In ultimo vorrei ricordare anche le Aziende che negli ultimi anni, con il loro contributo, ci hanno sostenuto e permesso di aumentare il numero dei nostri incontri nell'arco dell'anno che, ormai da tempo, sono raddoppiati.

Dott. Guido Grilli
Presidente SIPA

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA

**Malattie virali emergenti trasmesse dai
vettori: il ruolo degli uccelli selvatici nella
loro diffusione e valutazione
del rischio per l'avicoltura intensiva**

Pisa, 12 Novembre 2010

MICHELE DOTTORI
Le specie avicole allevate e le arbovirosi
trasmesse da culicidi

Le specie avicole allevate e le arbovirosi trasmesse da culicidi

Pisa, 12 novembre 2010

Dr. Michele Dottori
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione Diagnostica Provinciale di Reggio nell'Emilia



Tabella riassuntiva dei principali arbovirus diffusi su scala globale con riferimento alle specie vettrici di culicidi e agli ospiti serbatoio rappresentati da uccelli.

Virus	Specie vettrici principali	Ospiti serbatoio	Diffusione
Alphavirus			
Encefalite equina dell'est	<i>Culiseta melanura</i> , (ciclo selvatico)	Volatili	Americhe
Encefalite equina dell'ovest	<i>Culex tarsalis</i> (ciclo selvatico) <i>Ochlerotatus</i> spp.	Volatili, lagomorfi	Americhe
Sindbis	<i>Culex</i> spp., <i>Culiseta</i> spp., <i>Aedes</i> spp.	Volatili	Europa, Africa, Asia Minore, Sud Asia, Australia,

Virus	Specie vettrici principali	Ospiti serbatoio	Diffusione
Flavivirus			
Encefalite giapponese	<i>Culex tritaeniorhynchus</i> , <i>Culex</i> spp.	Volatili, maiale	Asia
West Nile	<i>Culex</i> spp.	Volatili	Tutto il mondo
Usutu	<i>Culex</i> spp.	Volatili	Africa, Europa
Encefalite St. Louis	<i>Culex</i> spp.	Volatili	Americhe
Encefalite della Murray Valley	<i>Culex annulirostris</i>	Volatili	Australia, Nuova Guinea
Kunjin	<i>Culex annulirostris</i>	Volatili	Australia, Nuova Guinea

Virus	Specie vettrici principali	Ospiti serbatoio	Diffusione
Bunyavirus			
Lendnice virus	<i>Culex modestus</i>	Volatili	Europa Africa

Arbovirus in Europa

- SINDBIS (WEE)
 - Alphaviridae
 - Culex
 - Passeriformi
 - Encefalite nei piccioni
 - Mortalità in polli adulti
- WNV
- LEDNICE VIRUS
 - Bunyaviridae
 - Culex
 - Anseriformi
 - Patogenicità?
- USUTU VIRUS

West Nile Virus

Il virus della West Nile Disease è un *Flavivirus* (famiglia *Flaviviridae*) appartenente al complesso antigenico della encefalite giapponese.

E' un arbovirus responsabile di encefaliti nell'uomo e nel cavallo.

Arthropod Borne Virus

Virus appartenenti al gruppo antigenico del virus dell'encefalite giapponese

Virus dell'encefalite giapponese (JEV)

Virus dell'encefalite della valle del Murray

Virus dell'encefalite St. Louis

Virus dell'encefalite West Nile (WNV)

Kunjin virus

Usutu virus (USUV)

Koutango virus

Yaounde virus

Cacipacore virus



7

West Nile Virus: Approximate Geographic Range, 2003

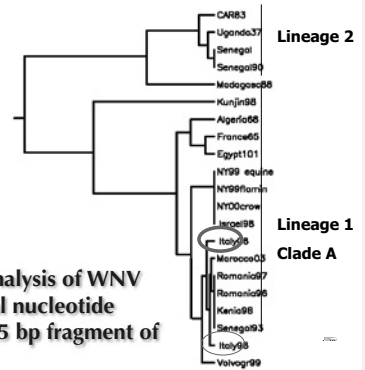


CDC

Genetica del Virus della West Nile

- Un sierotipo, Due Lineage del virus della West Nile
 - I ceppi del Lineage 2 sembrano meno patogeni. Presenti in Africa, ma recentemente segnalati anche in HU e AT.
 - Epidemie con sintomi nervosi sono associate al clade A all'interno del Lineage 1
- L'epidemia West Nile negli USA è sostenuta da un virus del **lineage 1 clade A** geneticamente omogeneo (omologia >99.7%)

9



Phylogenetic analysis of WNV based on partial nucleotide sequence of 255 bp fragment of the E gene

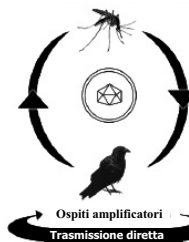
La WNV nel Bacino del Mediterraneo

- Il virus WN viene considerato endemico nel bacino del Mediterraneo
- Può circolare senza dare sintomi rilevabili
- Si manifesta con epidemie limitate, improvvise e imprevedibili (Emerging/Re-emerging disease)
- Generalmente circola in aree umide o nei delta dei fiumi, possibili cicli urbani (zanzare o uccelli "ponte").
- L'infezione entra in una nuova area con gli uccelli migratori

11

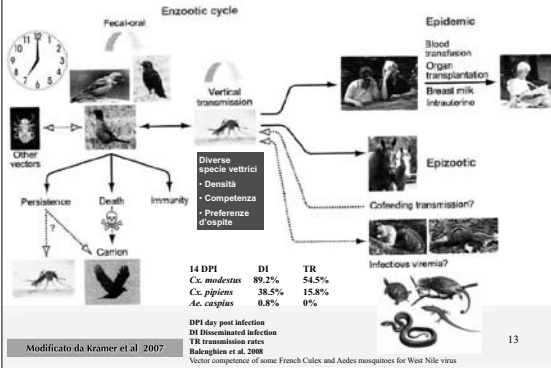
Virus West Nile: ciclo di trasmissione

Vettore biologico/serbatoio
Zanzare del genere *Culex*



L'infezione ha un ciclo silvestre tra un vettore biologico (zanzara) e un ospite amplificatore (uccelli selvatici). Tra gli uccelli selvatici ci può essere trasmissione diretta (ciclo oro-fecale; infez. orale da necrofagia)

WNV transmission cycle



Virus West Nile: i vettori

Isolato da più di 40 specie di zanzare appartenenti a 11 diversi generi

- Genere *Culex*:
 - *Cx. univittatus*, *Cx. perixiguus*, *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, and *Cx. vishnui*
- Altre zanzare di altri generi:
 - *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Mansonia*, *Mimomyia*

Isolato da zecche:

- *Argas*, *Ornithodoros*
- *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*.

Virus West Nile: i vettori

Il titolo virale ematico è uno dei fattori fondamentali per la trasmissione del virus.

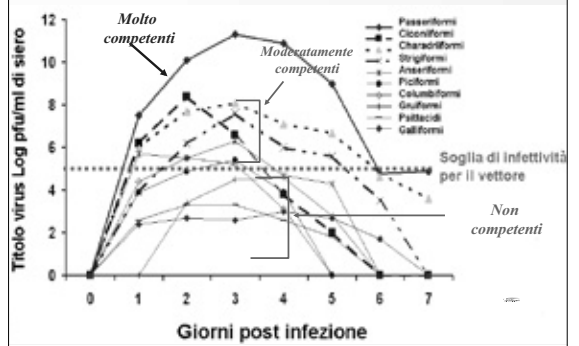
In prove di laboratorio su *Cx. tarsalis*:

- 74%-100% si infettano alimentandosi su animali con titolo $10^{7.1}$ PFU/ml
- 0%-36% si infettano alimentandosi su animali con titolo $10^{4.9}$ PFU/ml

Si considera pertanto infettante per il vettore un titolo virale di 10^5 PFU/ml

- Uomo: titolo max rilevato $10^{3.2}$ PFU/ml
- Cavallo: titolo rilevato $10^{2.7}$ PFU/ml

Sensibilità di ordini diversi di uccelli



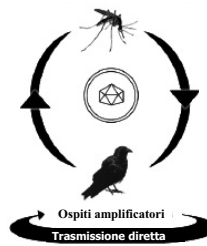
Species	Mean Days		Mean Peak		Viremia **	c***
	n	Infectious*	Infectious*	Viremia **		
Blue jay (Ghiandaia americana)	2	4	12.3	2.4		
Common grackle	6	3	9.4	1.0		
House sparrow (Passero)	6	3	8.9	0.9		
House finch (Ciuffolotto messicano)	2	6	8.8	0.8		
American robin (Pettiorosso americ.)	2	3	8.5	0.6		
Red-wing, blackbird (Merlo ali rosse)	3	3	8.1	0.5		
Mallard (Germano reale)	2	3	6.7	0.3		
European starling (Storno)	6	2	6.0	0.1		
Canada goose (Oca del Canada)	3	0	4.7	0		
American coot (Folaga americana)	1	0	4.6	0		
Rock dove (Piccione)	6	0	4.3	0		
Chicken	16	0	3.2	0		
Ring-neck Pheasant (Tortora)	3	0	2.7	0		

* Infectious viremia = log 5 or greater per ml serum; ** log pfu/ml serum
*** c = susceptibility * mean infectiousness * days infectious

Komar <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/misc/slides/komar/slide02.htm>

Virus West Nile: ciclo di trasmissione

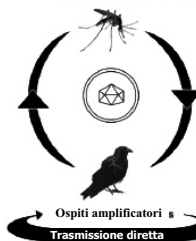
Vettore biologico/serbatoio
Zanzare del genere *Culex*



Ai climi temperati l'infezione assume un andamento stagionale: il ciclo silvestre si attiva a mag.-giu. (comparsa zanzare). La carica virale aumenta progressivamente (circolazione tra i nidiacei, soggetti non immuni) nei mesi di luglio e agosto.

Virus West Nile: ciclo di trasmissione

Vettore biologico/serbatoio
Zanzare del genere *Culex*



In determinate condizioni (non ancora chiarite) c'è talmente tanto virus nell'ambiente che inizia a circolare al di fuori del ciclo naturale. Quando ciò accade (da metà ago. a metà ott.), si iniziano a vedere sintomi.

WNV: Malattia Naturale

OCHE

UNGHERIA 2003

- Sintomi nervosi (atalassia, torcicollo, opistotono)
- Mortalità (14% in 4-5gg)
- Solo focolai giallastri in qualche soggetto
- Coinfezione da circovirus

ISRAELE 1997

- Lineage 1, 3-8W
- Mortalità 20-60%
- Vaccinazione

CANADA 2002

- 6 W, depressione, atalassia



WNV: Malattia naturale ANATRE

CANADA 2007



- Sintomi nervosi (paralisi delle ali, torcicollo)
- 17W
- Nessuna lesione

TACCHINI

USA 2003

- Un tacchino selvatico maschio
- Disorientamento e facilità di cattura



Infezione sperimentale WNV OCHE

• 2W S.C.

Depressione, dimagrimento, torcicollo, opistotono, emorragie petecchiali, atrofia timica e della borsa. Istologicamente: encefalite, miocardite.

• 3W S.C.

Sintomi nervosi, depressione, mortalità.

Dimostrata trasmissione del virus per contatto, ma non in ambienti adiacenti.

22

Infezione sperimentale WNV ANATRE

• 2W

Disappetenza, atassia.

• 4W

No sintomi.

• 3W S.C.

Nessun sintomo.

Viremia insufficiente per i vettori.

Escrezione nelle feci

No trasmissione per contatto

Sieroconversione

23

TACCHINI

Infezione sperimentale WNV POLLI

• 17-60 W

No sintomi, sieroconversione, viremia insufficiente per i vettori, escrezione, trasmissione per contatto in un caso.

Sentinelle ideali.

• 7 W S.C.

No sintomi, viremia, escrezione, anticorpi dopo 5gg.

No trasmissione per contatto.

• 3W S.P.F – S.C. e E.V.

No sintomi



Le zanzare sono più efficienti dell'ago?
(saliva?)

Anticorpi materni fino a 28gg, no
trasmissione verticale.

Fino a 11gg la viremia del pollo può infettare
le zanzare.



25

Sintomatologia negli uccelli

- Generalmente **asintomatici**
- Soggetti **giovani** più sensibili
- Sintomi neurologici (impossibilità di mantenere il capo eretto, letargia, atassia, postura inusuale) e deperimento
- Emorragie cerebrali, splenomegalia, meningoencefalite e miocardite
- Morte** negli uccelli particolarmente sensibili (corvidi, cicogne, oche)
- Nei sopravvissuti si instaura una **immunità di lunga durata**

26

Le **misure di prevenzione**, come per tutte le malattie trasmesse da vettori, sono finalizzate ad impedire il contatto tra gli animali (e gli uomini) suscettibili e i vettori infetti.



27

Prevenzione

sono buone pratiche:

- l'impiego di repellenti,
- il ricovero notturno dei cavalli all'interno delle scuderie,
- l'uso di ventilatori nelle scuderie,
- spegnere le luci all'interno delle strutture, mantenendone al contempo altre accese lontane dalle strutture di ricovero degli animali,
- mantenere gli uccelli fuori dalle scuderie e impedire la loro nidificazione in vicinanza o all'interno delle scuderie.

28

Prevenzione

Utile è anche la lotta al vettore attraverso trattamenti periodici, Più efficaci possono essere azioni quali:

- la rimozione di possibili luoghi di riproduzione delle zanzare (raccolte di acqua stagnante, stagni, tombini, ecc.),
- la pulizia e lo sfalcio della vegetazione circostante le strutture

29

Sorveglianza Vet.: Uccelli

POLLI SENTINELLA:

- Utilizzati dal 2001 al 2008
- 20 soggetti divisi in 2 gruppi
- sottoposti a prelievi sierologici quindicinali da apr. a nov.
- 1-2 stazioni (FE – RA)



Distribution of Japanese Encephalitis in Asia, 1970-1998

Source: Tsai TR, Chang GW, Yu YX. Japanese encephalitis vaccines. In Plotkin SA and Orenstein WA, eds., Vaccines - 3rd edition, WB Saunders, Inc., Philadelphia, PA, 1999;672-710

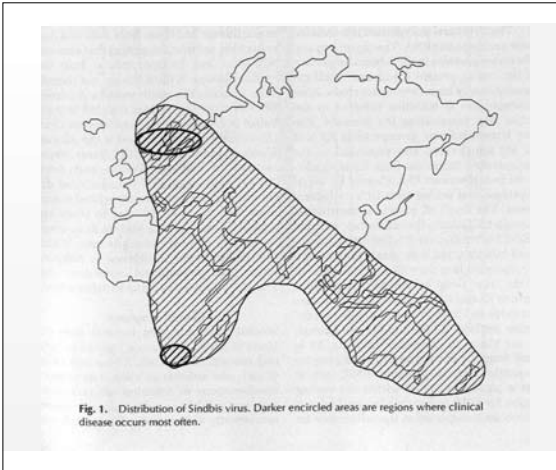
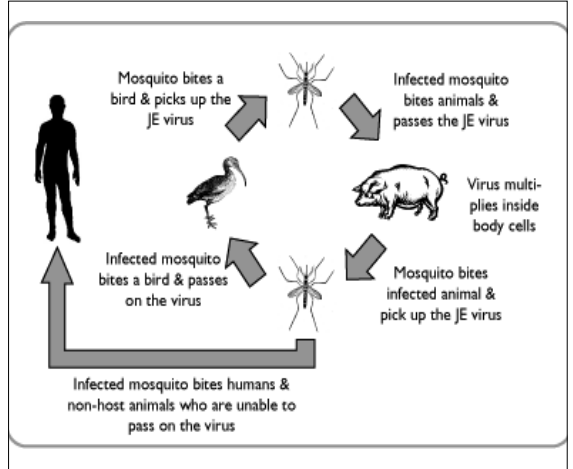


Fig. 1. Distribution of Sindbis virus. Darker encircled areas are regions where clinical disease occurs most often.

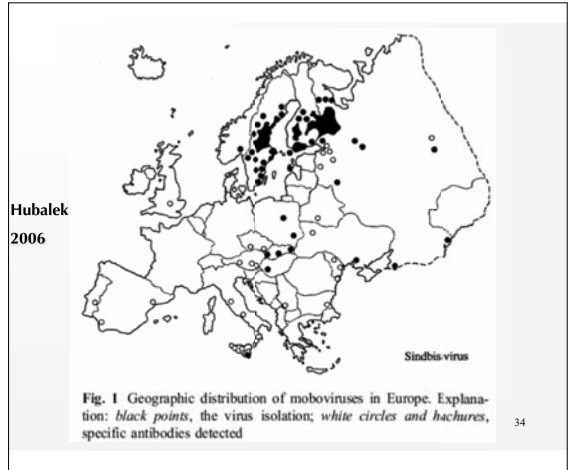


Fig. 1 Geographic distribution of moboviruses in Europe. Explanation: black points, the virus isolation; white circles and hachures, specific antibodies detected

SINDBIS, OCKELBO, KERELIAN FEVER, POGOSTA, WEE-EEE

CULEX spp.

Molte specie di uccelli

Anche roditori e pipistrelli

Encefalite nei piccioni

Nell'uomo febbre (3-4 gg), mal di testa, dolori muscolari, poliartrite, congiuntivite, faringite, RASH cutaneo.

USUTU

- E' un *Flavivirus* piuttosto poco noto del JEV group.
- Isolato per la prima volta in sud Africa da *bird-biting mosquitoes* (*Cx. univittatus*) nel 1959 (Williams et al. 1964)
- A parte uccelli e zanzare il virus è stato isolato anche in Africa da topi del genere *Praomys* sp. e da un uomo con febbre e rash (Gratz 2006)



Fuori dalla Africa

Weissenböck et al. 2002 descrive la circolazione del USUV in Austria tra agosto e metà settembre 2001, che ha comportato una mortalità stimata nel 30% dei *blackbirds* (*Turdus merula*) ma che comportato mortalità in numerose altre specie di uccelli.



Infezione sperimentale USUTU POLLI

- 2W E. V.

Nessun sintomo.
 Splemonegalia (encefalite ?)
 PCR positiva in 6/10
 Tamponi cloacali positivi (3)
 Tampone faringeo positivo (1)
 Viremia (2)
 Sieroconversione (1)
 No trasmissione

38

Infezione sperimentale USUTU OCHE

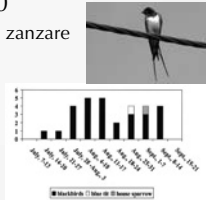
- 2W I.M.

Nessun sintomo.
 PCR positiva in 9/11
 Viremia e escrezione (1)
 Sieroconversione (3)
 No trasmissione

39

Introduzione e circolazione

- Il virus è stato introdotto probabilmente tramite uccelli migratori (ipotizzate rondini *Hirundo rustica*) già nel 2000
 - Overwinter del virus è ipotizzato in zanzare residenti (Austria)
- Nel 2002 nuova mortalità di nuovo principalmente nei merli espandendo area di circolazione



Weissenböck et al. 2002 e 2003

USUTU Emilia Romagna

- 2008 nessuna positività per USU rilevata in zanzare o uccelli, nello stesso anno (2 pool di zanzare risultano positive per WN)
- 2009 a seguito della evidenziazione del USUV in zanzare raccolte a luglio a fianco del piano di sorveglianza attiva nei confronti di corvidi (40 uccelli abbattuti per provincia) viene rafforzata la sorveglianza passiva nei confronti di altre specie di uccelli (soprattutto merli).

Tamba et al. 2010

41

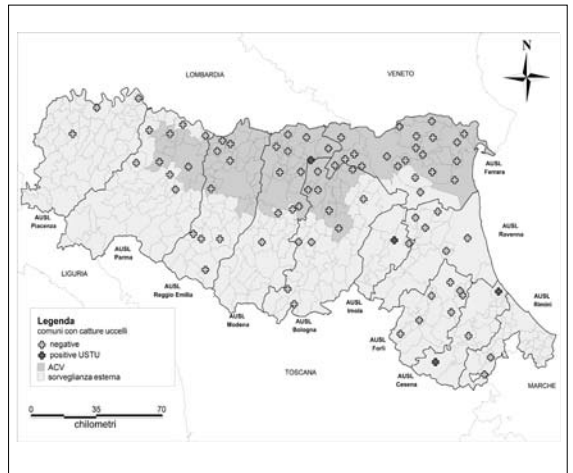
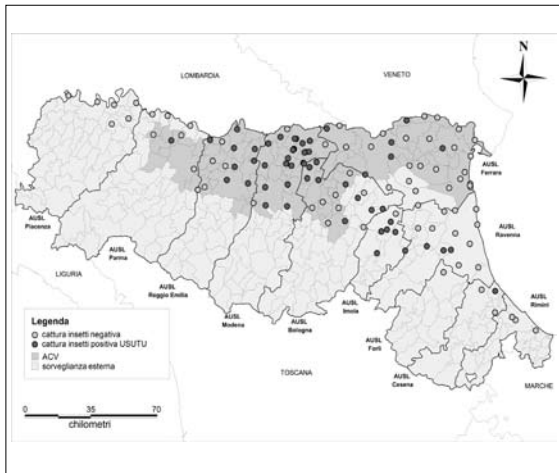
Risultati avifauna



Data del prelievo	Specie uccello	Prov	Comune	Morto/abbatt	PCR USUV	PCR WNV
19-ago	GAZZA	BO	Galliera	Abbatt	P	P
25-ago	GAZZA	FE	Ro	Abbatt	P	P
27-ago	Ghiandaia	BO	S.Giorgio di Piano	Abbatt	P	N
31-ago	Ghiandaia	BO	Sant'Agata Bolognese	Abbatt	P	N
10-set	GAZZA	FE	Masi Torello	Abbatt	P	N
13-set	GAZZA	FE	Argentina	Abbatt	P	N
18-set	STORNO	MO	Formigine	morto	P	N
28-set	Gabbiano	FE	Codigono	morto	P	P
28-set	MERLO	FE	Codigono	morto	P	N
09-ott	MERLO	RA	Riolo Terme	morto	P	N
26-ott	MERLO	FC	Forlì	morto	P	N

• Su 1218 uccelli testati 11 sono risultati positivi per USUTU (merli 10% dei testati, gazze, cornacchie, ghiandaie, storni). Il primo positivo è stato trovato in una gazza il 19 agosto e l'ultimo un merlo trovato morto 26 ottobre.

Tamba et al. 2010 unpublished yet;



PAOLO MANI

**Il ruolo degli uccelli selvatici nella diffusione
di Flavivirus mosquito-borne in Toscana**

Società Italiana di Patologia Aviare
Tavola Rotonda
 Pisa 12 Novembre 2010

*Malattie virali emergenti trasmesse dai vettori:
 il ruolo degli uccelli selvatici nella diffusione di
 Flavivirus mosquito-borne in Toscana "*

Paolo Mani
 Docente di Patologia Aviare
 Facoltà di Medicina Veterinaria
 Università di Pisa

Famiglia Flaviviridae



- Genere *Flavivirus*:
 - Tick borne
 - Mosquito borne
- Genere *Pestivirus*:
 - Diarrea Virale del Bovino-Malattia delle Mucose (BVD-MD)
 - Peste Suina Classica (PSC)
 - Border Disease
- Genere *Hepacivirus*:
 - Virus Epatite C

**Genere Flavivirus:
 virus mosquito-borne**



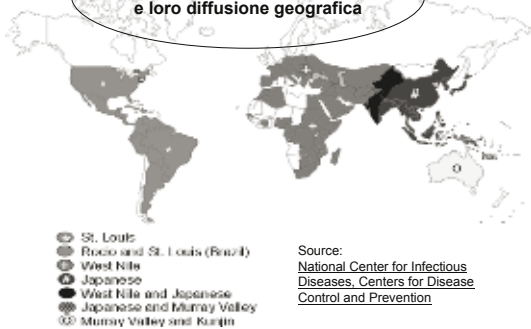
- Aroa virus Group (uomo)
 - Dengue virus Group (uomo)
 - Japanese encephalitis virus Group (uomo e animali)
 - Kokobera virus Group (uomo)
 - Ntaya virus group (uomo e tacchino*)
 - * Israel turkey meningoencephalomyelitis virus
 - Yellow fever virus group (uomo e animali **)
 - ** Wesselsbron virus in pecore, capre e bovini
- Da: "Zoonotic mosquito-borne Flavivirus" Weissnbock H. et al. Veterinary Microbiology 140 (2010) 271-280

**Japanese Encephalitis
 Virus Group (JE Group)**

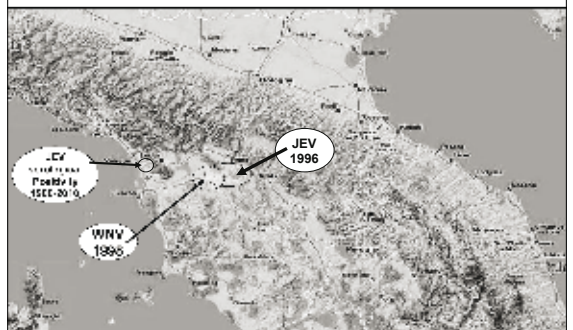
Da: "Zoonotic mosquito-borne
 Flavivirus" Weissnbock H. et al.
 Veterinary Microbiology 140
 (2010) 271-280

	Diff.Geogr.	Uomo	Animali
• <i>Cacipacore virus (CPCV)</i>	Brasile	?	?
• <i>Japanese encephalitis virus (JEV)</i>	Asia	+	+
• <i>Koutango virus (COUV)</i>	Senegal	+	?
• <i>Alfuy virus (ALFV)</i>	Australia	?	?
• <i>Murray Valley enceph.v. (MVEV)</i>	Australia/PNG	+	+
• <i>St.Louis encephalitis v. (SLEV)</i>	Americhe	+	+
• <i>Usutu virus (USUV)</i>	Africa/Europa	+	+
• <i>Kunjin virus (KUNV)</i>	Australia/Indonesia/Malaysia	+	?
• <i>West Nile virus (WNV)</i>	Mondo	+	+
• <i>Yaounde virus (YAOV)</i>	Africa	?	?

**Principali Flavivirus JE Group
 e loro diffusione geografica**



Flavivirus JE Group in Toscana



La cronaca



SCHEDA DI RILEVAMENTO

Viene pubblicata su:

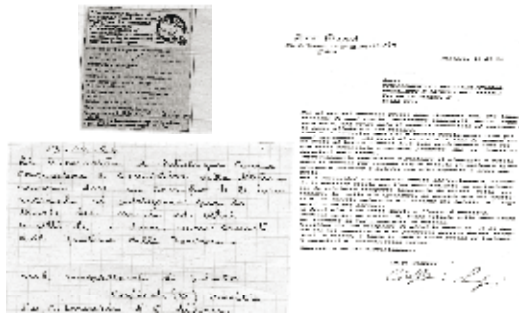
Tirreno

La Nazione

del 13/9/1996



...arrivano le prime segnalazioni..



1996

- 4 Settembre – 2 Ottobre.
- Area compresa fra Firenze, Pistoia e Prato.

41 uccelli selvatici esaminati:

- 38 rinvenuti morti
- 3 ancora vivi (muoiono dopo poche ore)

- Vengono osservati o riferiti Sintomi nervosi in:

Turdus merula
Sturnus vulgaris
Passer italiae
Turdus musicus *
 * uccelli da richiamo



Lesioni anatomo patologiche macroscopiche

- Escara cute addome
- Quadri congestivo emorragici:
 - SNC
 - Fegato
 - Milza
 - Pancreas



Esami di Laboratorio

Esame Istologico:

- Quadri congestizio emorragici a organi e visceri
- Lesioni parassitarie a organi e visceri
- Lesione micotica a livello di escara

Esami tossicologici negativi

Positività Parassitologica:

- *Capillaria spp.* (sangue-cuore)
- *Nematodi* (sede gastroenterica)
- *Protozoi* (sede ent.-epatica)
- *Trematodi* (coleciste)
- *Cestodi* (sede enterica)

Nel 1997 campioni di organi e tessuti delle diverse specie sono stati inviati al Central Research Institute of Epidemiology di Mosca.

Test IMMUNO ISTOCHEMICO

Anticorpo monoclonale diretto per: JE group

contro proteine capsidiche dei Flavivirus
del Gruppo Encefalite Giapponese

Materiale patologico risultato positivo:

- **SNC:** neuroni corticali, cellule gliali ed endoteliali
- **Pancreas:** cellule acinari e dell'infiltrato infiammatorio
 - **Rene:** cellule epiteliali dei tubuli
 - **Cuore:** fibre miocardiche
- **Midollo osseo:** elevato numero di cellule mieloidi

RT-PCR

Accession	Strain	Host	Country	Year	GenBank	Accession	Strain	Host	Country	Year	GenBank
U01701	JEV	Human	Japan	1954	U01701	U01701	JEV	Human	Japan	1954	U01701
U01702	JEV	Human	Japan	1954	U01702	U01702	JEV	Human	Japan	1954	U01702
U01703	JEV	Human	Japan	1954	U01703	U01703	JEV	Human	Japan	1954	U01703
U01704	JEV	Human	Japan	1954	U01704	U01704	JEV	Human	Japan	1954	U01704
U01705	JEV	Human	Japan	1954	U01705	U01705	JEV	Human	Japan	1954	U01705
U01706	JEV	Human	Japan	1954	U01706	U01706	JEV	Human	Japan	1954	U01706
U01707	JEV	Human	Japan	1954	U01707	U01707	JEV	Human	Japan	1954	U01707
U01708	JEV	Human	Japan	1954	U01708	U01708	JEV	Human	Japan	1954	U01708
U01709	JEV	Human	Japan	1954	U01709	U01709	JEV	Human	Japan	1954	U01709
U01710	JEV	Human	Japan	1954	U01710	U01710	JEV	Human	Japan	1954	U01710
U01711	JEV	Human	Japan	1954	U01711	U01711	JEV	Human	Japan	1954	U01711
U01712	JEV	Human	Japan	1954	U01712	U01712	JEV	Human	Japan	1954	U01712
U01713	JEV	Human	Japan	1954	U01713	U01713	JEV	Human	Japan	1954	U01713
U01714	JEV	Human	Japan	1954	U01714	U01714	JEV	Human	Japan	1954	U01714
U01715	JEV	Human	Japan	1954	U01715	U01715	JEV	Human	Japan	1954	U01715
U01716	JEV	Human	Japan	1954	U01716	U01716	JEV	Human	Japan	1954	U01716
U01717	JEV	Human	Japan	1954	U01717	U01717	JEV	Human	Japan	1954	U01717
U01718	JEV	Human	Japan	1954	U01718	U01718	JEV	Human	Japan	1954	U01718
U01719	JEV	Human	Japan	1954	U01719	U01719	JEV	Human	Japan	1954	U01719
U01720	JEV	Human	Japan	1954	U01720	U01720	JEV	Human	Japan	1954	U01720

Frammenti amplificati NSS ottenuti da due campioni positivi, sottoposti a sequenziamento diretto e confrontati con GeneBank di riferimento hanno dimostrato omologia (148 nucleotidi su 150) a:

JEV ceppo Ling (ACCESSION L78128)
l'omologia con genoma non-JEV è risultata inferiore all'80%;

Frammento di 552 nucleotidi del gene E-JEV estratto dall'RNA virale di 5 uccelli è risultato altamente omologo (differenze di 1-3 nucleotidi e 1 aminoacido) con:
ceppo NAKAYAMA/AF112298,
l'omologia con non-JEV genoma è risultata inferiore all'70%.

IL Virus JEV in Toscana pone
Interrogativi e ipotesi.....

Considerato che
JEV appartiene a:
JE Group mosquito-borne



Distribuzione geografica del virus dell'Encefalite Giapponese (JEV)

...Se:
l'escara nell'area apterile
addominale può essere la
"porta di ingresso" del virus...

Al vettore zanzara si può attribuire
la responsabilità di aver diffuso JEV
dall'Asia all'Europa?

si conferma l'ipotesi che il
Virus sia stato diffuso dal
vettore: zanzara

...sono di quegli anni le
segnalazioni della comparsa in Italia di
Un potenziale vettore:
Aedes albopictus

Ci siamo posti il quesito:
come verificare la presenza di JEV sul territorio?

•Principio Epidemiologico:
confutare/avvalorare le ipotesi

1. Indagini su popolazioni recettive
2. Indagini sull'ambiente
3. Indagini su potenziali vettori

Controlli sierologici:
•Test di screening: ELISA
•Eventuale conferma: SN

Cattura vettori
in aree a Rischio
Ricerca del virus:
RT-PCR

1) Indagini su popolazioni recettive

- Sono stati controllati 8 Centri di Produzione di Selvaggina : 7 di Fagiano ed 1 di Pernice.
- La scelta degli allevamenti da sottoporre a controllo ha considerato 6 differenti fattori di rischio epidemiologico (EFR):
 1. localizzazione in area o in prossimità di area dove sono stati segnalati gli episodi di WNV e JEV ;
 2. localizzazione in area favorevole per presenza dei vettori;
 3. presenza in allevamento di avifauna selvatica recettiva;
 4. presenza di avicoli di allevamento recettivi
 5. presenza nei dintorni del CPS di suini;
 6. presenza nei dintorni dell'allevamento di ospiti fondo cieco di infezione quali i cavalli.

Test di Screening:

- Controllo sierologico riproduttori
- ID Screen West Nile Competition
(ID VET Innovative diagnostic Montpellier)

Fagiano: Risultati

Breeding	Species	District	ERF	Years					
				1999	2002	2003	2004	2006	2007
Migliarino	Ph	PI	2, 3, 4, 5, 6	1999	2002	2003	2004	2006	2007
Fucecchio	Ph	PI	1, 2, 3, 4, 6	1999	2002	2003	2004	/	/
Le Pianora	Ph	PI	1, 2, 3, 4, 6	/	2002	2003	2004	/	/
Aulla	Ph	MS	3, 4	/	/	2003	2004	/	/
Montaione1	Ph	FI	3, 4	/	/	2003	2004	/	/
Montaione2	Ph	FI	3, 4	/	/	2003	2004	/	/
Cedri	Ph	PI	3, 5	/	/	2003	2004	/	/
Scarlino	Pa	LI	2, 3	/	/	/	/	/	2007

Sono risultati positivi

Il CPS è sito all'interno del Parco naturale regionale di Migliarino S. Rossore Massaciuccoli e presenta 5 FRE su 6:

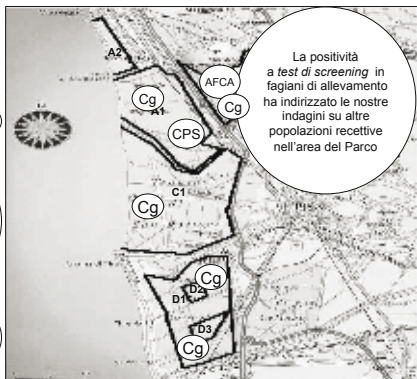
- **FRE 2:** l'allevamento è sito in area favorevole ai vettori zanzare responsabili nell'area di studio di: *Mixotatosi nel coniglio selvatico e Microfilariosi in corvidi*;
- **FRE 3:** nell'allevamento è presente avifauna selvatica recettiva. Alcune voliere particolarmente ricche di vegetazione sono dormitorio stabile per passerii e temporaneo per altri piccoli passeriformi migratori;
- **FRE 4:** all'interno dell'allevamento è presente un pollaio con galline, anatre, tacchini e pavoni e nidificano stabilmente alcune coppie di piccioni;
- **FRE 5:** all'esterno del recinto è presente il cinghiale (*Sus scrofa*). Il CPS si trova infatti all'interno del Parco Naturale dove la popolazione del cinghiale raggiunge una discreta densità.
- **FRE 6:** l'allevamento confina con un centro ippico dove sono presenti fattrici, stalloni e puledri.

AREA DI STUDIO

CPS
Fagiano

Anatre da richiamo
Fisso
Caccia
Acquatici

Cinghiale



Anatre da richiamo



	Anatre da richiamo		
	Esaminati	Positivi	%
1° prelievo 06/02/09	9 adulti	3	33,3
2° prelievo 08/06/08	9 giovani 12 adulti	0 4	0 33,3
3° prelievo 21/07/09	21 giovani	0	0
4° prelievo 02/10/09	12 giovani	0	0
Totale	63	7	11,1

Anatre: Fattori di Rischio Epidemiologico

- Esposizione al contagio durante l'attività venatoria (da Settembre a Gennaio) *;
- Allevamento in area a rischio per presenza di vettori *;
- Vicinanza al CPS con positività nel fagiano *.



Cinghiale



Test ELISA Kit: ID Vet	Cinghiali		
	Esaminati	Positivi	%
2008	18	13	72,2
2009	30	11	36,7
Totale	48	24	50

Cinghiale: Risultati

- nel 2008 su animali adulti di diversa età catturati nel periodo autunno invernale si evidenzia la positività del 72,2%*;
- nel 2009 sono risultati positivi 3 soggetti giovani nati nell'anno.

* Prevalenza analoga a quella rilevata in :

•*Detection of Antibodies against Japanese Encephalitis Virus in Raccoons, Raccoon Dogs and Wild Boars in Japan.*

da :

•Yoshito OHNO, Hiroshi SATO, Kazuo SUZUKI, Mayumi YOKOYAMA, Shigehiko UNI, Takahiro SHIBASAKI, Mariko SASHIKA, Hisashi INOKUMA, Kazushige KAI and Ken MAEDA

•**J. Vet. Med. Sci. 71(8): 1035–1039, 2009**

Equidi

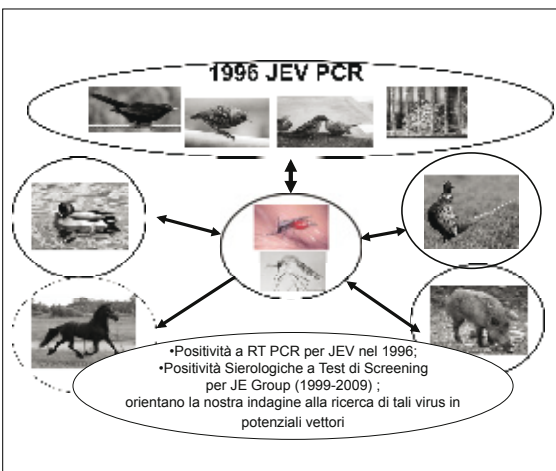
- Cavalli:
 - 11 esaminati
 - 1 soggetto positivo a due prelievi successivi eseguiti a distanza di 3 mesi.
 - Asini:
 - 1 esaminato (negativo a nostro Test Elisa)*
- *Risultato dubbio al test ELISA a Teramo.

Test di conferma: SN

Nel Gennaio 2010 n°46 sieri: 17 positivi (2 di cavallo, 7 di anatra e 8 di cinghiale) e 29 negativi (10 di cavallo, 1 di asino, 10 di anatra e 8 di cinghiale) sono stati inviati al Centro di Referenza presso l'IZS di Teramo dove sono stati sottoposti a *standard test* di sieroneutralizzazione per WNV e USUV e a test ELISA competitiva.

Il CESME ha comunicato i seguenti risultati:

- tutti i sieri esaminati di cinghiale, anatra e cavallo sono risultati negativi a SN per WNV;
- n°2 sieri di anatra sono positivi a titolo 1:5 e 1:10 per USUV.
- Al test ELISA competitivo sono confermate le positività e le negatività in sieri di cavallo e anatra esaminati.



Ricerca del virus nelle zanzare

- Due *Trappole per la cattura di zanzare (BG-SENTINEL, I.N.D.I.A. Padova)* sono state posizionate in siti da noi considerati ad elevato rischio epidemiologico:
- a casa di Pietro, un bambino che nella primavera del 2010 è stato colpito da una forma benigna di meningite. La trappola è stata posizionata nei pressi del recinto dove sono presenti un cavallo ed un asino, questo ultimo dubbio a Teramo a test ELISA;
- all'interno del pollaio dove sono allevate anatre da richiamo positive al test di screening con prevalenza del 33%.

Sito 1			
Data	<i>Aedes</i> spp.	<i>Culex</i> spp.	% <i>Aedes</i> spp.
15/07/2009	146	19	94%
30/07/2009	146	30	83%
22/09/2009	86	6	93%
30/09/2009	142	22	87%
07/10/2009	93	25	79%
14/10/2009	86	41	68%
25/10/2009	21	42	33%
30/10/2009	2	6	25%
17/11/2009	0	0	-
26/11/2009	0	0	-

Sito 2			
Data	<i>Aedes</i> spp.	<i>Culex</i> spp.	% <i>Aedes</i> spp.
16/10/2009	89	35	67%

Risultati

- Il campione di *Culex* spp. prelevato il 7 Ottobre 2009 nella trappola predisposta presso il primo sito è risultato positivo per USUTU virus, rilevato e confermato attraverso sequenziamento parziale del gene che codifica per l'NS5.
- Tutti i campioni sono risultati negativi sia per WNV che per JEV.

Il virus USUTU nelle zanzare e l'Area di Studio

- La località dove sono state catturate le zanzare positive ad USUV è all'interno di una area ricca di potenziali vettori e serbatoi.



Considerato che nella Profilassi Primaria al primo posto c'è l'INFORMAZIONE....

Il nostro scopo non è quello di segnalare che:

"Siamo arrivati primi!!!"



Come spesso accade i risultati non sono un traguardo ma un punto di partenza.....con molti interrogativi.

Nel Cavallo: quale significato può avere la positività sierologica a Test Elisa per WNV.....

.....quando il Test di conferma: SN risulta negativo?

La positività sierologica del cinghiale potrebbe indicare un ruolo epidemiologico particolare di tale specie recettiva e "ospite amplificatore" di JEV in Asia?

..... ma che i nostri risultati:

- stanno segnalando un "Problema complesso"



USUTU virus in zanzare?

JEV: Mortalità in uccelli in Toscana?

Aedes albopictus:
• cavallo di Troia di JEV?
• potenziale vettore di JE Group Virus?

Grazie per l'attenzione

ROSSELLA LELLI
**Il ruolo del centro di referenza
delle malattie esotiche**



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Il ruolo del centro di riferimento delle malattie esotiche

Rossella Lelli
IZS AeM

Pisa 12 Novembre 2010




Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali

- Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sono **Enti Sanitari di ricerca**, strumento del **Ministero della Salute**.
- La **mission** è “fornire servizi basati sulla conoscenza e sull’innovazione, ad elevato valore aggiunto, a tutela della Salute Pubblica, della Sanità animale e dell’ambiente”




I centri di riferimento: cosa sono

- Secondo la legge italiana

Un Centro di riferimento nazionale è uno **strumento operativo** di elevata e provata competenza localizzato presso un IZS che svolge **attività specialistiche** nei settori della **sanità animale**, della **sicurezza alimentare**, dell’**igiene degli allevamenti** e dell’**igiene zootecnica**




Centri di Riferenza Nazionali a TE(1)

- Centro di Riferenza Nazionale per lo studio e l'accertamento delle malattie esotiche degli animali (**CESME - Centro Studi Malattie Esotiche**);
- Centro di Riferenza Nazionale per l'epidemiologia veterinaria, la programmazione, l'informazione e l'analisi del rischio (**COVEPI**);
- Centro di Riferenza Nazionale per le **Brucellosi**;




Centri di Riferenza Nazionali (2)

- Laboratorio Nazionale di Riferimento per **Campylobacter**;
- Laboratorio Nazionale di Riferimento per **Listeria monocytogenes**;
- Laboratorio Nazionale di Riferimento per **Diossine** (PCDD/PCDF) e **Policlorobifenili** (PCB) in mangimi e alimenti destinati al consumo umano
- Centro Servizi Nazionale per l'identificazione e la registrazione dei bovini e bufalini, ovi-caprini, suini, aviari ed acquacoltura (**Anagrafe animale**).




Centri di Riferenza Internazionali

- Centro di Collaborazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (**OMS**), della Food and Agriculture Organization (**FAO**), dell'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (**OIE**).
- Laboratorio di Riferenza dell'OIE per le **Brucellosi**, la **Pleuropolmonite contagiosa dei bovini** (1993), la **Bluetongue** (2005) e la **West Nile Disease** (2010).
- Centro di Collaborazione dell'OIE per la **Formazione Veterinaria, l'Epidemiologia, la Sicurezza Alimentare e il Benessere Animale** (2004).





CESME

- **Decreto del Ministero della Sanità 2 Maggio 1991**
“Inizio dell’attività del centro di referenza nazionale per le malattie esotiche”
- **Decreto del Ministero della Sanità 4 ottobre 1999**
“Centri di referenza nazionali nel settore veterinario”




**Compiti istituzionali:
CESME (1)**

- Attività diagnostica
- Gestione delle emergenze
- Produzione e controllo della qualità dei reagenti diagnostici e dei vaccini
- Formazione ed aggiornamento professionale
- Collaborazione e consulenza a livello nazionale ed internazionale





**Compiti istituzionali:
CESME (2)**

- Ricerca su:
 - Metodi diagnostici
 - Epidemiologia
 - Vaccini e strategie di vaccinazione
 - Piani di emergenza
- Coordinamento sul territorio di supporto al Ministero della salute in caso di emergenza epidemica
- Corsi di aggiornamento sulle metodiche di analisi e di diagnosi e sulla gestione delle emergenze (compresa l’organizzazione dell’indagine epidemiologica)





**Compiti istituzionali:
CESME (3)**

- Rapporti di collaborazione con i centri di referenza presso gli organismi internazionali e con questi provvedere ad un interscambio di materiali e tecnologie in grado di garantire una continua verifica delle proprie capacità funzionali

Formazione ed addestramento

- **Diagnostica virologica e sierologica**
 - Definizione delle procedure operative standard secondo metodi di riferimento e validazione delle stesse
- **Entomologia**
 - Supporto tecnico agli IZZSS e alle ASL coinvolte nelle attività di cattura e caratterizzazione sul territorio nazionale
- **Organizzazione di circuiti interlaboratorio**




**Formazione ed addestramento
a livello internazionale (1)**

- **Diagnostica virologica e sierologica**
 - **Italia: BT**
 - **Bulgaria:** formazione teorico-pratica per la diagnosi sierologica e virologica della WND;
 - **Namibia:** formazione teorico-pratica sulla caratterizzazione dei ceppi di Mycoplasma;
 - **Eritrea:** training sulle metodiche classiche e biomolecolari utilizzate per la diagnosi di Brucellosi e Peste dei Piccoli Ruminanti (Twinning OIE);
 - **Cuba:** formazione teorico-pratica, sulla diagnosi sierologica della Pleuropolmonite Contagiosa Bovina (PPCB) e sulla caratterizzazione di Mycoplasma sp (Twinning OIE)





Formazione ed addestramento a livello internazionale (2)

• Entomologia

- Italia
- **Croazia** (Croatian Veterinary Institute)
- **Albania** (Institute of Veterinary Research, Tirana)
- **Malta** (Ministry for Rural Affairs and the Environment, Food Veterinary Regulation Division, Al bertown, Marsa)
- **Romania** (National Institute of Diagnosis and Animal Health Bucharest)
- **Kosovo** (Central Veterinary Laboratory)
- ...



Formazione ed addestramento a livello internazionale (3)

• Entomologia

- ...
- **Argentina** (Instituto Nacional de Teconologia Agropecuaria INTA, Castelar, Buenos Aires)
- **Slovenia** (Parasitology laboratory at Veterinary Faculty, University in Ljubljana)
- **Lettonia** (National Diagnostic Centre, Riga)
- ...



Formazione ed addestramento a livello internazionale (4)

• Entomologia

- ...
- **Austria** (Museo di Storia Naturale di Vienna)
- **Turchia** (Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara)
- **Slovak Republic** (State Veterinary Institute)
- **Repubblica Ceca** (State Veterinary Institute, Jihlava)



Produzione e distribuzione reagenti

Nel 2009

- **Kit c-ELISA per la diagnosi sierologica di BTV** sufficienti all'esame di 146.475 sieri, sul territorio nazionale
- **32.000 dosi di antigeni PPCB** per il test di Fissazione del Complemento;



Banca sieri e antigeni

- Raccolta dei **sieri dei bovini sentinella** nell'ambito del Piano di Sorveglianza Nazionale per la BT conservati nella banca sieri nazionale dell'Istituto

Nel 2009 sono stati aggiunti **4123 nuovi sieri** prelevati in **14 regioni italiane** dai bovini sentinella.



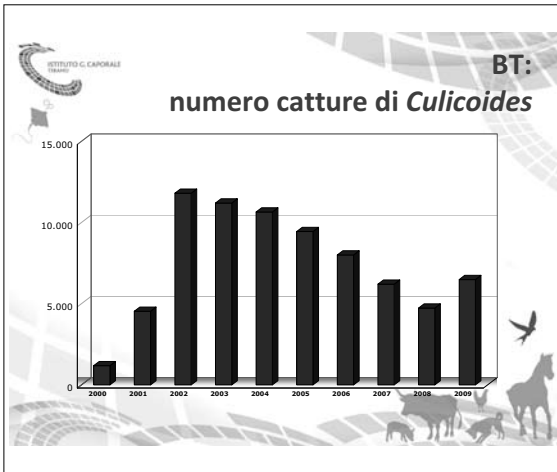
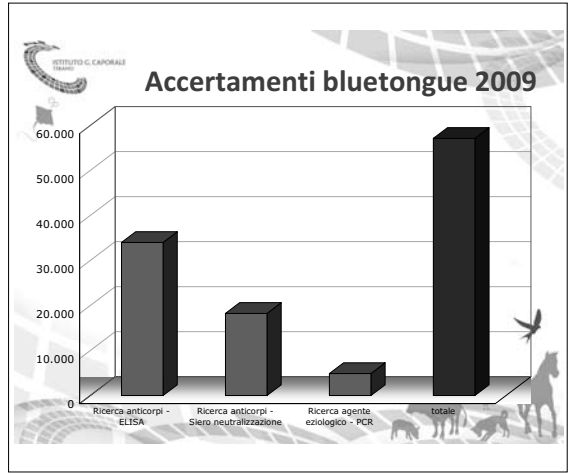
Newsletter



- Dal 2008 è regolarmente realizzato e distribuito **Newsletter** il trimestrale d'informazione dell'Istituto G. Caporale

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Attività diagnostica, in numeri....



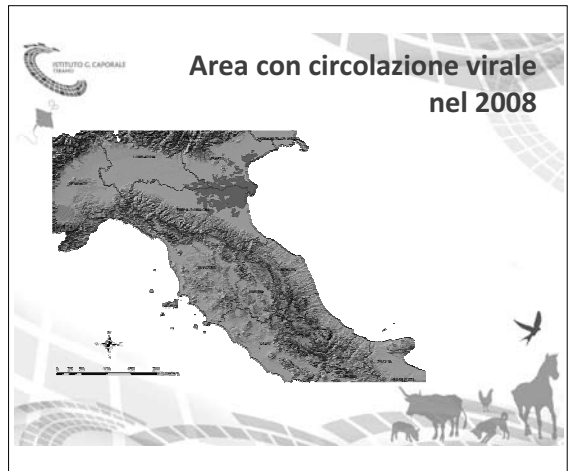
ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

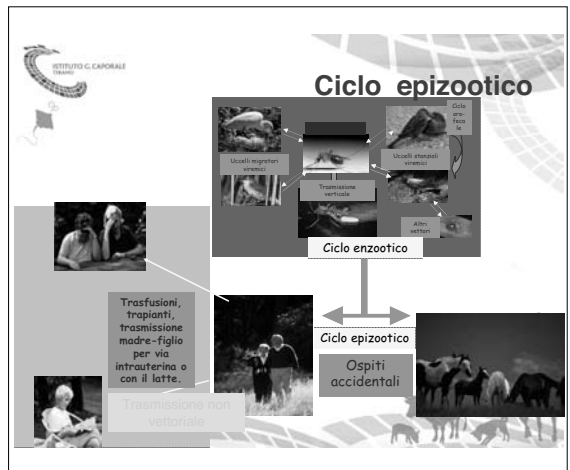
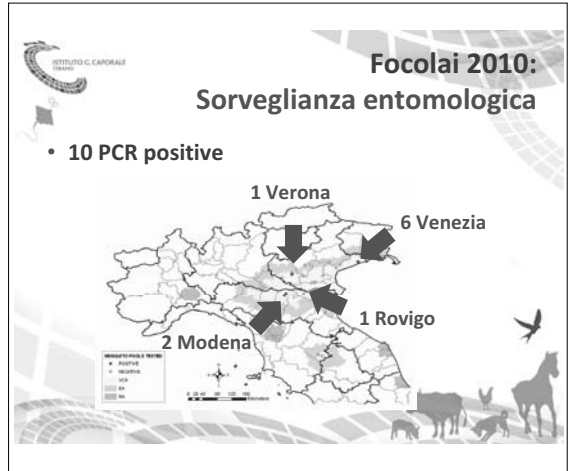
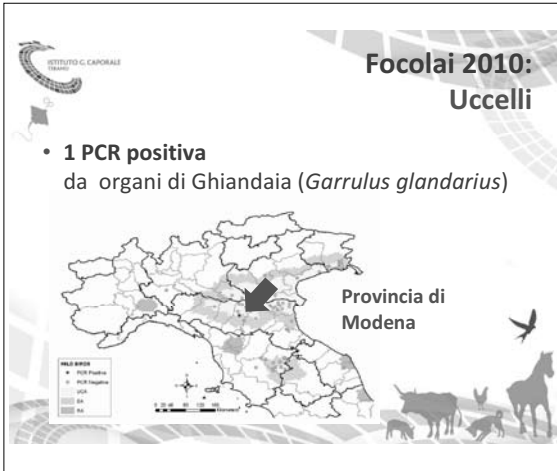
West Nile Disease

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Piano di sorveglianza nazionale

- **Sorveglianza negli equidi**
 - Cavalli sentinella
- **Sorveglianza negli uccelli**
 - Polli sentinella
 - Screening carcasse selvatici rinvenuti morti o soppressi nell'ambito di piani per il controllo di popolazione
- **Sorveglianza Entomologica**
 - Cattura ed identificazione





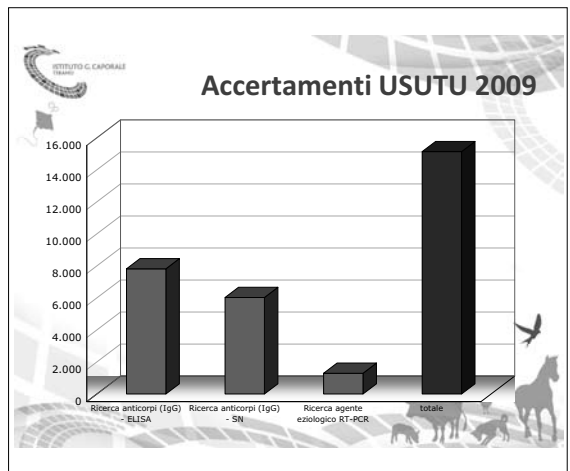
Primo caso di meningoencefalite da Usutu virus nell'uomo

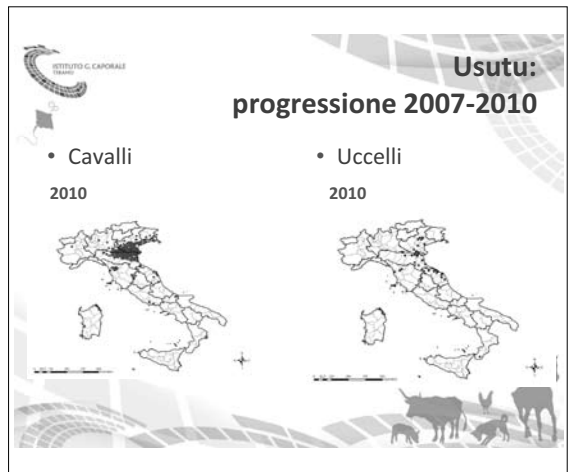
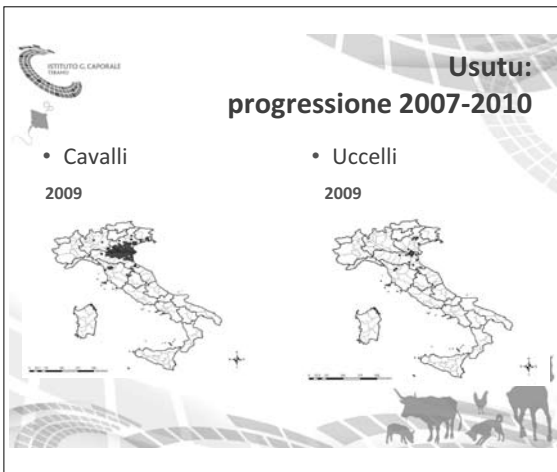
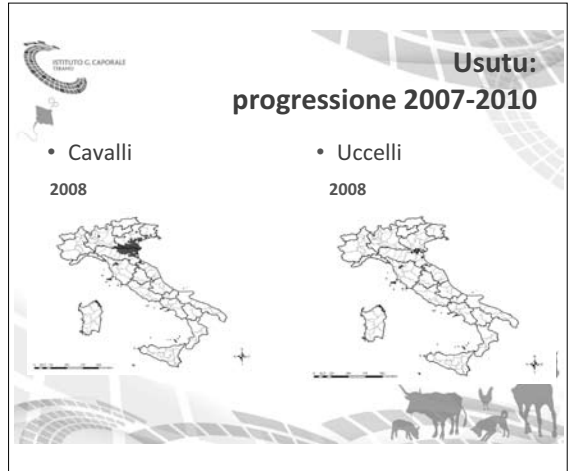
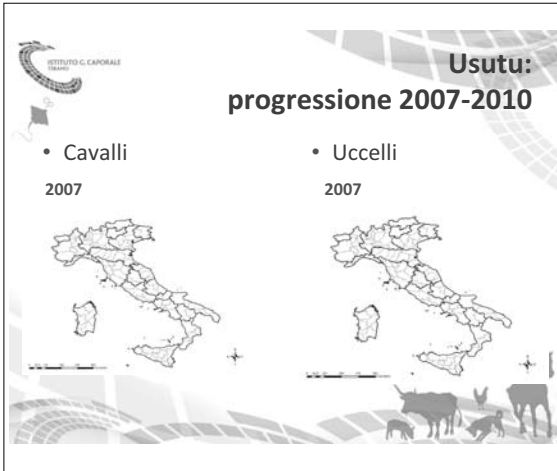
FIRST HUMAN CASE OF USUTU VIRUS NEUROINVASIVE INFECTION, ITALY, AUGUST-SEPTEMBER 2009

M. Pascari¹, E. Caporale², M. G. Di Lorenzo³, G. Longo⁴, W. Sennari⁵, A. Gennaro⁶, A. M. Santarini⁷, S. Tagliacozzi⁸, S. Scatelli⁹, F. Rinaldi¹⁰, A. S. Sironi¹¹, A. Luzzi¹², F. Santolucito¹³

¹Department of Diagnostic and Laboratory Services and Legal Medicine, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ²Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ³Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ⁴Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ⁵Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ⁶Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ⁷Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ⁸Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ⁹Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ¹⁰Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ¹¹Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ¹²Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy; ¹³Department of Diagnostic and Laboratory Services, University of Modena and Reggio Emilia, Azienda Ospedaliera Policlinica, Modena, Italy

www.eurosurveillance.org





ISTITUTO G. CAPORALI

I Sistemi informativi

ISTITUTO G. CAPORALI

Accesso a SIMAN: il portale unico del sistema informativo veterinario

AUTENTICAZIONE dell'operatore:

- ✓ nome utente
- ✓ password
- ✓ smart-card con certificato digitale

<https://www.vetinfo.sanita.it/>

Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario (BENV)

ISTITUTO G. CAPORALE

BENV

Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario

Una sgaritta alle mosche

Pezzi di Botteghe

Pezzi di anatomia, fisiologia e patologia

<http://www.izs.it/BENV/home.html>

Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario (BENV)

ISTITUTO G. CAPORALE

BENV

Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario

Una sgaritta alle mosche

Pezzi di Botteghe

Pezzi di anatomia, fisiologia e patologia

<http://www.izs.it/BENV/home.html>

Sistema informativo di supporto alle azioni di sorveglianza per la WND

- Schede precompilabili in BDN
- Bollettino periodico
- Report integrati in SIMAN

ISTITUTO G. CAPORALE

ISTITUTO G. CAPORALE

Report West Nile Disease

OIE Btnet (1)

L'Organizzazione Mondiale per la Sanità Animale (OIE) ha attivato un **network dei laboratori di riferimento** al fine di raggiungere i seguenti obiettivi:

- scambio di **informazioni** e di **materiali diagnostici** nell'ottica di armonizzare, standardizzare e validare i test di laboratorio;
- ...

ISTITUTO G. CAPORALE

La formazione sulle malattie esotiche degli animali

- Ha un ruolo strategico nella gestione delle malattie emergenti e riemergenti.
- Assume spesso un carattere di urgenza.
- Risulta efficace perché dotato di:
 - un sistema rapido di rilevazione dei fabbisogni di formazione collegati alle emergenze;
 - risorse formative in grado di soddisfare con tempestività tali fabbisogni.

ISTITUTO G. CAPORALE

La scelta dell'eLearning

- E' la modalità formativa che più efficacemente risponde all'esigenza di una **diffusione rapida di conoscenze e competenze** per gestire emergenze epidemiche e non;
- raggiunge un **numero elevato di partecipanti in un tempo definito** e inferiore alle tradizionali metodologie d'aula.

ISTITUTO G. CAPORALE

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIA

L'evoluzione del sistema (2)

- **Sperimentazioni in:**
 - Sicurezza alimentare
 - Epidemiologia
 - Malattie esotiche
 - Biosicurezza
- **Fondi MIUR e MS** per un totale di circa 1 milione di € negli ultimi 5 anni

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIA

Un esempio

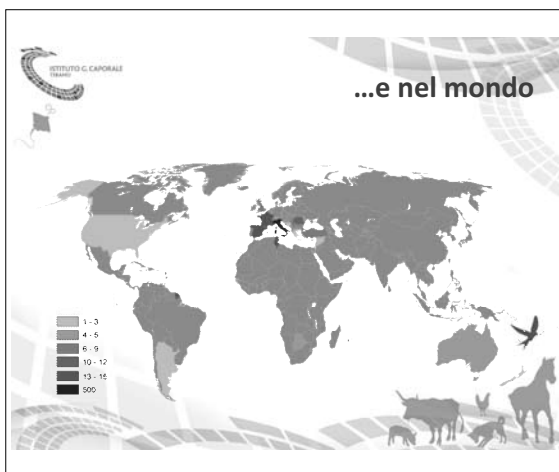
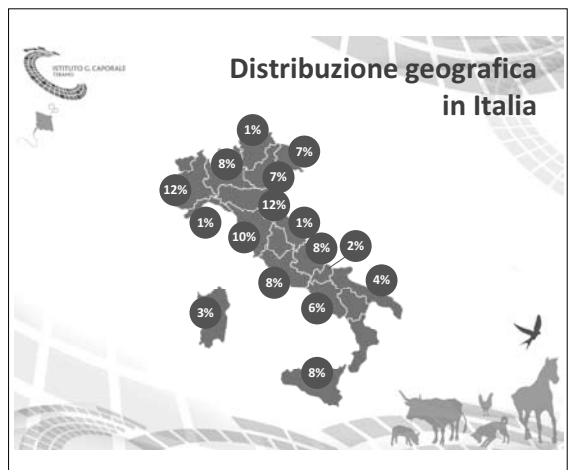
- Agosto 2008: focolaio di West Nile Disease nel nord Italia
- Dopo 40 giorni il **CESME** ha messo a disposizione del SSN un **corso di formazione a distanza sul riconoscimento, la diagnosi e il controllo della WND**
- **In meno di quattro mesi sono stati formati (con il riconoscimento dei crediti formativi ECM) 453 veterinari ufficiali**

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIA

Formazione a distanza 2009-2010 sulle malattie trasmesse da artropodi

- Corsi erogati: **7**
- Totale edizioni: **12**
- Beneficiari: **742**
- Ore di formazione: **182**
- *African Horse Sickness, Bluetongue, Crimean Congo Haemorrhagic Fever, Eastern, Western and Venezuelan Equine Encephalites, Rift Valley Fever, West Nile Disease*

<http://www.fad.izs.it/exact/X-Siter/default.asp>



ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIA

Formazione tradizionale 2010

- Corso di formazione "**Foreign Animal Diseases**" in collaborazione con l'Università di Pretoria (Sud Africa), Centro di collaborazione OIE
- Durata complessiva: 9 giornate
- Beneficiari: Veterinari del Sistema Sanitario Nazionale (50 crediti ECM)
- Docenti: esperti nazionali ed internazionali (Sud Africa, Francia, Grecia, USA, UE, GB)



Le Collaborazioni internazionali

- Paesi nei quali l'IZS ha svolto o ha in corso attività e rapporti di collaborazione o cooperazione



Cooperazione internazionale: esempi recenti (1)

- **Ufficio sub regionale dell'OIE a Tunisi:**
Rete di sorveglianza per i Paesi dell'area mediterranea
- **Eritrea:** "Supporto al programma nazionale eritreo per il controllo della Brucellosi e della Tuberculosis in allevamenti bovini da latte".



Cooperazione internazionale: esempi recenti (2)

- **SIVTRO-Saharawi:** il CESME collabora con la SIVTRO nel supporto tecnico-operativo in merito a problematiche di sanità animale presenti nelle tendopoli dei profughi del popolo Saharawi, attualmente localizzate nel deserto algerino.



Twinning OIE

- Botswana: PPCB
- Cuba: PPCB
- Eritrea: Brucellosi
- Tunisia: Bluetongue
- Namibia: Sicurezza alimentare



Collaborazioni internazionali

- **L'esempio Namibia:**



Laboratorio Namibia



ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIO

Laboratorio Namibia



Sperimentazione e Challenge di un vaccino inattivato e adjuvato per la Peste Equina sierotipo 9.

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIO

Laboratorio Namibia



Valutazione degli effetti collaterali a livello cutaneo a seguito dell'inoculazione di nuovi adjuvanti vaccinali nei cavalli.

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIO

Laboratorio Namibia



Studio del Morbo Coitale Maligno attraverso attività di campo in Africa Meridionale (Namibia e Botswana) e messa a punto di metodiche diagnostiche e produzione di reagenti e kit.

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIO

Laboratorio Namibia



Studio della Heartwater Disease attraverso l'osservazione di focolai naturali e attraverso l'infezione sperimentale di ovini.

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIO

Laboratorio Namibia



Documentazione dello stato sanitario e dei movimenti del Bufalo Africano in una riserva naturale transfrontaliera.

ISTITUTO G. CAPORALE
VETERINARIO

Laboratorio Namibia



Supporto nella diagnosi di alcune malattie ad eziologia virale (Febbre della Valle del Rift, Arterite Virale Equina e Peste Equina).

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Laboratorio Namibia



Produzione e raccolta di sieri immuni per la Peste Equina, la Febbre della Valle del Rift e MCM.

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Laboratorio Namibia



Formazione del personale dipendente del Central Veterinary Laboratory e dei veterinari libero-professionisti attraverso l'organizzazione di corsi teorico-pratici e giornate di studio

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Attività di ricerca

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Ricerca: I vaccini

- La BT, vivo attenuato- inattivato - ricombinante
- La Peste equina
- La PPCB

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Ricerca: La diagnostica

- West Nile Disease
- USUTU virus
- Bluetongue
- Rift Valley Fever
- Crimean Congo Haemorrhagic Fever (le zecche, gli uccelli migratori, i metodi diagnostici.....)
- Peste dei Piccoli Ruminanti

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Ricerca: La patogenesi

- Identificazione dei **determinanti patogenetici del BTV**
- è stata determinata l'intensità e la durata della viremia in bovini infettati con dosi diverse di **BTV8**
- studio sulla capacità di alcuni ceppi di **BTV-8** di **passare la barriera placentare** delle pecore

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Ricerca:

I progetti

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Medronet

- Progetto Europeo FP6 sulla sorveglianza delle malattie trasmesse da Culicoides (BT, AHS, EHD).

- WP 1: Sorveglianza regionale sull'attività virale e sui vaccini
- WP 2: Sorveglianza regionale dei vettori,
- WP 3: Epidemiologia Molecolare
- WP 4: Database, web design & GIS
- WP 5: Valutazione del rischio
- WP 6: Incontri e divulgazione,
- WP 7: Coordinamento generale,
- WP 8: Gestione

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

EFSA

CFP/EFSA/AHAW/2008/04

- Review scientifiche sulla Crimean Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) e sulla Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD)
- Reviews accessibili sul sito EFSA agli indirizzi:
 - <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/019e.pdf> (CCHF)
 - <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/020e.pdf> (EHDV)

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

EPISTIS (1)

Remote sensing tools to study the epidemiology and space/time dynamics of diseases

- Progetto di ricerca finanziato dal **Ministry for Science Policy** del Belgio.
- Raccolta, analisi ed organizzazione dei **dati relativi ai vettori ed allo sviluppo dei relativi modelli di diffusione**, atti a caratterizzare e definire la distribuzione della popolazione dei vettori sulla base delle caratteristiche genetiche.

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

KBBE-2007-1-3-06 (2)

Emerging vector-borne diseases, in particular West Nile Fever, Rift Valley Fever and Crimean-Congo Haemorrhagic Fever - ARBOZOONET

- Sviluppare un sistema integrato di **controllo per le zoonosi trasmesse da artropodi**. I capisaldi del programma sono il controllo dei vettori, il programma di vaccinazione e il miglioramento degli strumenti diagnostici e dei sistemi di sorveglianza;
- ...

ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

KBBE-2007-1-3-06 (2)

Emerging vector-borne diseases, in particular West Nile Fever, Rift Valley Fever and Crimean-Congo Haemorrhagic Fever - ARBOZOONET

- ...
- E' stato ospitato a Teramo il **secondo meeting annuale** con l'organizzazione di un corso teorico-pratico sui metodi diagnostici per la West Nile Disease (20 partecipanti, 13 Paesi)




E, per fare meglio e di più



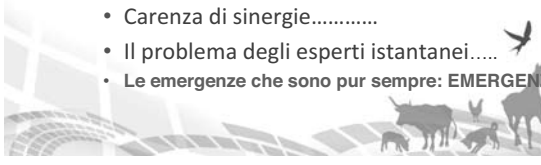

.....ci siamo dotati di: Laboratori trasportabili

- Nell'ambito delle attività di diagnosi e ricerca sui patogeni esotici, a Giugno del 2010 è stato installato nella sede centrale di Teramo un **laboratorio trasportabile ad alto contenimento biologico (BSL-4)**, unica struttura di questo tipo per uso veterinario in Italia.

E, infine, i limiti.....

- Mancanza di pianificazione
- Carenze di comunicazione
- Mancanza della famosa rete.....
- Carenza di sinergie.....
- Il problema degli esperti istantanei.....
- Le emergenze che sono pur sempre: **EMERGENZI**




ATTI DEL I CONVEGNO ANNUALE

INCONTRO

**Situazione sanitaria dell'avicoltura italiana:
focus sulle principali malattie
osservate durante il 2010**

Forlì, 7-8 Aprile 2011

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO IN ITALIA

Ana Moreno

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

Via Bianchi 7/9, 25124, Brescia. E-mail: anamaria.morenomartin@izsler.it

La Bursite infettiva (IBD) rappresenta da tempo, e in particolare negli ultimi decenni, un importante problema sanitario ed economico dell'allevamento avicolo intensivo. L'importanza economica della malattia deriva fondamentalmente da due fattori: il primo è legato alla sintomatologia clinica e mortalità, il secondo e più importante deriva dalla grave e prolungata immunodepressione dei soggetti infettati in età precoce.

È una malattia sostenuta da un virus (IBDV) appartenente alla famiglia *Birnaviridae* caratterizzato dall'assenza di *envelope* e dalla presenza di un genoma a RNA a doppia elica bi-segmentato. Si riconoscono 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.

Fino alla fine degli anni '80, la malattia veniva controllata abbastanza facilmente mediante misure di profilassi indiretta (vaccinazione). Successivamente, sono stati 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. In Europa è stata osservata la comparsa di quadri di IBD acuta caratterizzati da mortalità elevate attribuiti a ceppi dotati di elevata patogenicità, i c.d. "*very virulent*", in assenza di *drifts* antigenici significativi. 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.

Studi di caratterizzazione antigenica e genomica, condotti precedentemente su ceppi isolati dal 1996 al 2005, 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 sia genomiche diverse dai ceppi vvIBDV tipici.

Studi di caratterizzazione condotti successivamente fino al 2009 hanno rilevato un aumento dei ceppi vvIBDV con caratteristiche genomiche atipiche, così come un aumento dei ceppi derivati dai ceppi vaccinali.

È stato inoltre identificato un nuovo gruppo di ceppi le cui caratteristiche genomiche non sono correlabili con i ceppi vvIBDV circolanti in Europa. Lo scopo di questo lavoro è quello di continuare la caratterizzazione genomica dei ceppi identificati durante l'attività diagnostica tramite il sequenziamento parziale della regione ipervariabile della proteina VP2.

EPIDEMIOLOGIA DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

Massi Paola, Tosi Giovanni

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Sezione Diagnostica di Forlì, Via Marchini, 1 - 47100 Forlì. E-mail: paola.massi@izsler.it

Il virus della Bronchite Infettiva aviare (IBV) è un coronavirus, causa della bronchite infettiva aviare, patologia largamente diffusa a livello mondiale e responsabile di ingenti danni economici nell'allevamento intensivo del pollo. Trattasi di una malattia altamente contagiosa, caratterizzata da sintomi respiratori, enterici, patologia renale o lesioni genito-urinarie con gravi danni per la deposizione e la qualità del guscio. Il virus causale è ad RNA a singolo filamento e provvisto di envelope. La conoscenza di alcune caratteristiche della composizione genica del virus è di fondamentale importanza al fine di comprendere l'estrema variabilità virale e la costante presenza endemica della patologia. Il genoma del virus codifica per 4 proteine strutturali: la glicoproteina spike (S), il nucleocapside (N), la glicoproteina di membrana (M) e la proteina dell'envelope (E). La proteina S, ed in particolare il frammento S1, è la parte più esposta del virus che interviene nell'attacco alla cellula ospite, comprende la maggior parte dei determinanti antigenici ed è pertanto responsabile della formazione delle nuove varianti. Nel corso degli anni in Italia sono state tante le varianti isolate in campo, differenti fra loro dal punto di vista sierologico, genotipico e patogenetico. Nel mondo ad oggi sono stati riconosciuti circa 50 sierotipi che saranno destinati a crescere. Le problematiche legate al controllo della bronchite infettiva, dovute principalmente alla notevole variabilità antigenica dell'IBV e alla non sempre ottimale cross-protezione tra sierotipi differenti, rendono necessario il costante monitoraggio dei ceppi circolanti sul territorio nazionale al fine di poter implementare le misure di biosicurezza e schemi vaccinali adattati ai singoli allevamenti.

Sulla base dei dati raccolti dalla Sezione di Forlì dell'IZSLER nel corso del 2010 la prevalenza dei genotipi di IBV nel territorio appare diversificata. Sono stati identificati 7 diversi genotipi circolanti: 793B, QX-like, Massachusetts, IT02, 624/I, B1648 e D274. Il genotipo più diffuso rimane il 793B, anche se il metodo di analisi utilizzato, non differenziando fra i ceppi vaccinali e quelli di campo potrebbe aver sovrastimato la diffusione di questo genotipo ampiamente utilizzato come vaccino vivo attenuato. Il genotipo QX-like si conferma in ampia diffusione, mentre si assiste alla sia pur sporadica ricomparsa dei genotipi 624/I e B1648.

In particolare, vengono descritte le caratteristiche patogenetiche del sierotipo QX-like e le misure di profilassi vaccinale adottate nel nostro Paese nelle diverse tipologie produttive.

MALATTIA DI MAREK NEI RIPRODUTTORI PESANTI: UNA MALATTIA RIEMERGENTE DEL SETTORE AVICOLO?

Alessandra Piccirillo

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

La Malattia di Marek (MD) è una malattia linfoproliferativa dei polli a diffusione mondiale, causata da un *Alphaherpesvirus*, denominato MDV o *Gallid Herpesvirus 2* (GaHV-2), strettamente cellulo-associato. Le lesioni causate dal virus sono caratterizzate da un'infiltrazione di cellule mononucleari di tipo linfocitario nei nervi periferici e in altri tessuti e organi, compresa iride e cute.

MDV causa una molteplicità di sindromi differenti, alcune delle quali molto difficili da diagnosticare per l'assenza di sintomatologia manifesta. Fra le varie sindromi, quella che assume maggiore importanza è la forma linfomatosa con presenza di tumori in numerosi organi e tessuti, seguita dalla paralisi, malattia neurologica persistente, leucosi cutanea e lesioni oculari. A volte, la malattia si accompagna a immunodepressione, poiché il virus causa un'infezione linfocitolitica e atrofia della borsa di Fabrizio e del timo, con conseguente ridotta risposta umorale.

Prima dell'utilizzo della vaccinazione (introdotta negli anni '70), la malattia di Marek era in grado di causare ingenti perdite economiche, con mortalità fino al 60% nelle galline ovaiole e il 10% di scarto alla macellazione nei broiler. A seguito dell'introduzione della vaccinazione, i danni causati dalla malattia si sono drasticamente ridotti, per cui la MD non ha più rappresentato un grave pericolo per l'industria avicola. Negli ultimi anni, però, si è registrato un aumento nella segnalazione di casi di malattia in diversi Paesi del mondo, compresa l'Italia.

Fra il 2010 e gli inizi del 2011 diversi casi di Malattia di Marek sono stati registrati in allevamenti di riproduttori pesanti del Nord Italia. Da sottolineare che i gruppi di animali erano stati tutti vaccinati con vaccino bivalente congelato HVT e Rispens. La malattia ha colpito diversi gruppi di riproduttori, di età compresa fra le 29 e le 57 settimane. In tutti gli episodi, non si è registrata alcuna variazione dei parametri produttivi (in particolare percentuale di ovodeposizione e schiudibilità della uova). La sintomatologia era quella tipica della forma viscerale, in cui si osservava un deperimento progressivo degli animali, fino alla cachessia, con mucose pallide. Non si è mai osservata sintomatologia di tipo nervoso nei casi indagati, come anche fenomeni di immunodepressione. La mortalità era molto variabile: dal 2-3% fino al 20%, con punte del 30% in casi particolarmente gravi. Nelle femmine si osservava una maggiore incidenza della malattia. Anche le lesioni anatomico-patologiche non si discostavano da quelle comunemente riportate nella forma viscerale della malattia. In tutti i casi era presente epato- e splenomegalia, in alcuni casi con presenza di linfomi. Altre lesioni, più raramente osservate, erano: linfomi a livello di polmoni, ovaio, muscoli, stomaco ghiandolare indurito, aumentato di volume con parete ispessita e in alcuni casi con ulcere, noduli tumorali cutanei, in corrispondenza dei follicoli delle penne, con maggiore coinvolgimento del distretto femorale. In alcuni casi, contemporaneamente alle lesioni determinate dalla Malattia di Marek, alla necropsia si evidenziavano anche lesioni riconducibili a infezione da *E. coli*, con

pericardite e peritonite, ed in un caso coccidiosi causata da *E. necatrix*. La diagnosi della malattia veniva confermata con l'esame istologico e il rilievo del virus con metodi biomolecolari. All'istologia si rilevava infiltrazione di cellule linfatiche pleomorfe a livello di fegato e milza. In un solo caso, era evidente lo stesso tipo di infiltrazione a livello interfollicolare nella borsa di Fabrizio. La diagnosi molecolare veniva eseguita con una *duplex* PCR in grado di confermare la presenza del virus in campioni tissutali (fegato, milza e penne) e distinguere fra ceppi di campo (*very virulent*) e ceppi vaccinali di MDV. L'origine di questi episodi rimane oscura, ma le ipotesi sono: rottura d'immunità per errore nella vaccinazione, in presenza di virus di campo particolarmente virulento, rottura d'immunità in una piccola percentuale di soggetti (5-6%) che, non essendo protetti, hanno contratto l'infezione e sviluppato la malattia, ed infine presenza di virus di campo particolarmente virulenti in grado di superare la protezione indotta dagli attuali vaccini disponibili in commercio. A seguito di questi episodi di malattia, si è intensificata la strategia vaccinale sottoponendo tutti i gruppi successivi a doppia dose vaccinale con due differenti vaccini, inoculati in due sedi diverse (sottocute al collo e intramuscolo alla coscia).

MICOPLASMI E MICOPLASMOSI NEL SETTORE AVICOLO

Salvatore Catania

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD). E-mail: scatania@izsvenezie.it

I micoplasmi sono microrganismi unicellulari privi di parete cellulare, tale caratteristica conferisce loro la resistenza a diverse molecole antibiotiche. Le specie di micoplasmi ad oggi conosciute sono numerose e oltre 100 sono le specie comunemente riconosciute. Tali microrganismi possono infettare una ampia varietà di specie viventi appartenenti sia al regno vegetale che al regno animale, uomo compreso. In ambito veterinario sono molte le specie considerate di interesse e specificatamente in campo aviario se ne contano oltre 25, sebbene solamente quattro di queste siano considerate di rilevanza nel settore industriale. In particolare queste sono rappresentate da *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) *Mycoplasma meleagridis* (MM) e *Mycoplasma iowae* (MI).

Tra le specie di micoplasmi aviari considerate minori è forse opportuno segnalarne alcune per il loro dimostrato potere patogeno, *Mycoplasma imitans* è stato correlato ad alcuni episodi di sinusite in volatili allevati a fini venatori, mentre *Mycoplasma corogypis* è stato descritto in corso di forme asessuali localizzate a livello dei cuscinetti plantari in rapaci.

Allo stato attuale non è possibile escludere il coinvolgimento di altre specie di micoplasmi in tali ambiti produttivi nonostante il loro ruolo patogeno non sembri essere ad oggi del tutto chiaro.

Tornando al settore avicolo industriale tra le quattro specie di micoplasmi di maggiore interesse possiamo ricordare MG ed MS, quali causa di patologie nel pollo e nel tacchino, mentre MM ed MI come patogeni specifici del tacchino.

Mycoplasma gallisepticum provoca nel pollo e nel tacchino una forma respiratoria di entità piuttosto seria, coinvolgendo inizialmente le vie aeree superiori con interessamento dei seni e conseguente sinusite (in particolare nel tacchino), per poi diffondersi anche a livello dei sacchi aerei con aerosacculite. Negli animali in deposizione si manifesta un importante calo della deposizione di uova ed una decolorazione delle stesse.

Mycoplasma synoviae può causare una forma respiratoria rilevante, anche se il reperto di aerosacculite è meno frequente rispetto all'MG, ed un'artrosinovite con alterazione della deambulazione. Quest'ultimo quadro sintomatologico è maggiormente evidente nei soggetti pesanti e nel tacchino maschio.

Il ruolo di MS nello sviluppo di tali forme è, ad oggi, sottoposto ad intensa ricerca scientifica e sembrerebbe che sia anche coinvolta una reazione di tipo autoimmune nella patogenesi della lesione.

Recentemente l'infezione da MS nella gallina ovaiole è stata correlata a specifiche alterazioni del guscio delle uova.

Mycoplasma iowae causa mortalità embrionale nel tacchino e rappresenta uno dei pochi patogeni di questa specifica fase, i pulcini venuti a morte presentano un caratteristico arruffamento delle piume delle regione del petto, tale lesione anatomopatologica è da considerarsi patognomica di infezione da MI.

Mycoplasma meleagridis, considerato ad oggi un patogeno specifico del tacchino, causa alterazione della crescita ed evidenti alterazioni dello sviluppo scheletrico delle zampe.

La forma respiratoria è presente, anche se piuttosto blanda e piccoli depositi fibrinosi possono essere reperiti a livello dei sacchi aerei. Recentemente, alterazioni della conformazione della colonna vertebrale sono state correlate all' infezione da MM.

Data la possibilità dei micoplasmi di trasmettersi anche per via verticale, il loro controllo nel settore avicolo industriale viene effettuato attraverso la creazione di gruppi di riproduttori *Mycoplasma-free*. Tale strategia ha prodotto buoni risultati nei confronti di MM e MI, infatti le ultime segnalazioni di tali patogeni nel territorio italiano risalgono ad oltre un decennio fa.

Al contrario per MG e per MS tale strategia non sembrerebbe aver determinato l' eradicazione di questi agenti, sebbene abbia sicuramente contenuto il numero di focolai di malattia.

Dal punto di vista epidemiologico ancora oggi sono presenti alcuni punti oscuri, principalmente dovuti all' insufficienza di strumenti diagnostici, capaci di distinguere tra loro ceppi appartenenti alla stessa specie. L' inadeguatezza dei mezzi diagnostici contribuisce alla mancata individuazione della fonte di ingresso del patogeno. Infatti l' ipotesi più frequente riguardante la fonte di ingresso è solitamente riferita alla trasmissione orizzontale diretta od indiretta da gruppi di avicoli rurali posti nelle vicinanze del gruppo infetto o in alternativa la possibile diffusione del patogeno mediante uccelli selvatici.

Le metodiche biomolecolari hanno migliorato le nostre possibilità diagnostiche e rappresentano un valido strumento per approfondire la situazione epidemiologica del settore avicolo italiano, permettendo di chiarire alcuni punti che ad oggi rimangono poco chiari.

La raccolta di dati epidemiologici e la conservazione dei ceppi possono fornire valide basi per una speculazione sulle possibili o maggiormente probabili fonti di infezione, che una volta individuate possono essere correttamente gestite con adeguate misure di contenimento.

Durante l' attività diagnostica svolta nel corso del 2010 abbiamo potuto isolare differenti specie di micoplasmi provenienti da volatili.

In particolare sono stati effettuati 738 isolamenti con metodica microbiologica classica. Di questi campioni, 355 provenienti da pollo, 233 da tacchino e 33 da gallina faraona: I rimanenti 117 campioni provenivano invece da specie avicole varie quali, starna, fagiano, colombo, falco, etc., che possono essere considerate "minori".

Il *Mycoplasma synoviae* è risultato essere la specie maggiormente isolata con 107 isolamenti di cui 74 da pollo, 29 da tacchino, 3 da faraona ed 1 da Fenicottero minore.

Per quanto riguarda il *Mycoplasma gallisepticum* gli isolamenti sono stati 20 sia su pollo che tacchino e 2 in gallina faraona. Risulta di interesse la segnalazione che durante la stagione 2010 in alcuni allevamenti infetti da MG la sintomatologia è risultata essere più blanda con un interessamento delle prime vie aeree. Tale MG è stato sottoposto ad alcune prove di laboratorio, quali crescita a differente temperatura che ha dimostrato una maggiore propensione del batterio a crescere *in vitro* a temperature più basse dei 38°C. Inoltre su alcuni ceppi sono stati effettuati

alcuni approfondimenti biomolecolari al fine di poterli distinguerli dal ceppo di campo classico.

Infine rimane da segnalare l'isolamento di *Mycoplasma meleagridis* in tacchini e galline faraone allevati per la conservazione ed il mantenimento delle razze avicole regionali. Tale segnalazione seppur non proveniente dal settore industriale dimostra la presenza nel territorio italiano di una delle specie di micoplasmi patogeni considerati importanti per il settore avicolo industriale.

Altre specie di micoplasmi sono state isolate durante il 2010 tra queste possiamo elencare il *Mycoplasma iners*, il *Mycoplasma gallinarum* ed il *Mycoplasma gallinaceum*, *Mycoplasma cloacale* riscontrabili anche in specie allevate a fini industriali, e il *M. columborale*, il *M. glycyphilum* ed il *M. buteonis* dimostrabili solamente in specie avicole considerate di nicchia.

La stagionalità delle infezioni nel 2010 ha mostrato un *trend* simile a quello del 2009 con un incremento dei gruppi infetti già a partire dalla tarda primavera, tale dato fa presupporre un ruolo delle temperature nella diffusione di tali patologie.

LE CLOSTRIDIOSI AVIARI: AGGIORNAMENTI E NUOVE SFIDE

Luca Bano

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Diagnostica Clinica di Treviso,

Viale Brigata Treviso 13/a, 31100, Treviso. E-mail: lbano@izsvenezie.it

Le specie clostridiche ritenute patogene per il pollame sono 10 anche se le malattie classificate come vere e proprie “clostridiosi aviari” sono sostanzialmente quattro: enterite necrotica; dermatite gangrenosa; enterite ulcerativa (quail disease) e botulismo aviare.

Gli ultimi anni sono stati caratterizzati dalla comparsa sempre più frequente di alcune patologie clostridiche che erano ritenute in passato solo delle evenienze sporadiche. In modo particolare nella presente relazione, verranno trattate la dermatite gangrenosa e il botulismo aviare. Entrambe rappresentano delle sfide “nuove” per l'avicoltura non solo italiana ma anche europea.

Dermatite gangrenosa

La dermatite gangrenosa del pollo è una malattia polifattoriale ad eziologia batterica, in cui i clostridi, e soprattutto *C. septicum*, appaiono rivestire il ruolo più importante. La patogenesi di tale malattia è poco nota e si dibatte sulla possibilità che le lesioni cutanee siano conseguenza di infezioni da clostridi giunti in tali sedi attraverso soluzioni di continuo della cute, oppure che gli agenti eziologici e le tossine raggiungano la cute e il sottocute per via ematogena, originando dall'intestino. Ciò che è certo è che la prevalenza della malattia negli allevamenti di polli e tacchini da carne è in espansione dal 1993, anno della sua comparsa in USA.

Le due specie clostridiche più frequentemente implicate in episodi di dermatite gangrenosa sono *C. septicum* e *C. perfringens* tipo A. La malattia può essere complicata anche dalla simultanea presenza di *S. aureus* che rende le lesioni più gravi. In alcuni casi di dermatite gangrenosa sono stati isolati anche il *C. novy* e *C. sordellii*. Il *C. septicum* è un batterio anaerobio obbligato sciamante e la cui patogenicità è collegata alla possibile produzione di 4 tossine: alfa (citolisina “letale” ad azione necrotizzante), beta (DNasi), delta (emolisina ossigeno-sensibile), gamma (ialuronidasi). L'alfa tossina è strutturalmente ed antigenicamente diversa da quella prodotta da *C. perfringens*, viene secreta come una “pro-tossina” ed è attivata da proteasi prodotte da cellule dell'ospite (es. furina). E' il fattore di virulenza più importante di *C. septicum* poiché è stato dimostrato che la delezione del gene che la codifica (*csa*) rende il ceppo apatogeno in modelli animali sperimentali.

L'insorgenza della dermatite gangrenosa può essere favorita da fattori predisponenti quali la presenza di ferite cutanee, la simultanea coinfezione di virus ad azione immunodepressiva (malattia di Gumboro, anemia infettiva, reticoloendoteliosi, infezioni da adenovirus e reovirus, malattia di Marek), carenze nutrizionali (aminoacidiche, vitamina E, zinco e sali minerali che fanno sì che incrementi l'aggressività nel gruppo), micotossicosi, errori manageriali (insufficiente pulizia e disinfezione tra i cicli, inadeguata gestione della lettiera e delle carcasse, sovraffollamento che causa stress ed eccessiva competizione alle mangiatoie e/o agli abbeveratoi ecc).

La dermatite gangrenosa è stata segnalata sia in polli che in tacchini da carne. In quest'ultima specie viene chiamata "cellulite" e colpisce più frequentemente i maschi che le femmine. Nel pollo la malattia è solitamente segnalata in soggetti da carne d'età compresa tra le 4 e le 7 settimane mentre nel tacchino compare tra le 13 e le 18 settimane, anche se vi sono segnalazioni a 7 settimane. Attualmente la cellulite del tacchino è considerata una delle malattie economicamente più penalizzanti negli Stati Uniti (la 3^a causa di mortalità nel tacchino su 34 prese in esame). In Europa esistono solo sporadiche segnalazioni in questa specie dove, al contrario di quanto avviene negli USA, le lettiera vengono di solito interamente sostituite tra un ciclo e l'altro, mentre è più frequente nel pollo. Non è ancora chiaro se la malattia sia conseguenza di una infezione trans-cutanea oppure se i clostridi o le loro tossine giungano alla cute attraverso il circolo, originando dall'intestino.

I sintomi della dermatite gangrenosa sono a rapida evoluzione e l'esito è quasi sempre infausto con mortalità solitamente del 2-3% nel tacchino e variabili dall'1 al 60% nel broiler. Gli animali manifestano marcata depressione, incoordinazione dei movimenti e morte nel giro di 24 ore. Le carcasse degli animali deceduti in seguito a dermatite gangrenosa vanno incontro rapidamente a fenomeni di lisi post-mortale.

Le lesioni sono solitamente localizzate nelle regioni prive di penne o parzialmente impiumate, quali: faccia ventrale dell'ala, faccia mediale delle cosce, regioni costali, addome e regione pettorale. Nelle zone cutanee colpite si osserva edema emorragico diffuso, con o senza enfisema e la cute si presenta umida. La muscolatura sottostante è pallida o grigiasta e vi possono essere infiltrazioni di liquido sieroso-emorragico e/o gassose tra le fasce muscolari. A livello epatico possono essere presenti dei focolai enfisematosi crepitanti come conseguenza di fermentazioni clostridiche.

La borsa di Fabrizio si presenta piccola e flaccida a causa della frequente concomitante presenza del virus della malattia di Gumboro. Nel tacchino si osserva frequentemente un rammollimento del parenchima renale.

La diagnosi si basa sull'osservazione delle caratteristiche lesioni e sull'isolamento di alcuni o di tutti gli agenti eziologici sopramenzionati. Il carcinoma a cellule squamose del pollo può indurre lesioni simili a quelle della dermatite gangrenosa e l'esame istologico potrebbe essere necessario per differenziare le due patologie. La profilassi vaccinale è stata tentata sperimentalmente nel tacchino con risultati promettenti. E' altresì importante intervenire con un buon protocollo vaccinale nei confronti di malattie predisponenti quali la malattia di Gumboro nel pollo e l'enterite emorragica nel tacchino. La profilassi diretta consiste nel migliorare lo stato della lettiera, evitare traumi o competizioni all'interno del gruppo, ridurre l'umidità e la carica microbica ambientale. Le terapie dimostrate efficaci prevedono l'utilizzo di antibiotici quali: tetracicline, eritromicina, penicillina, solfato di rame nell'acqua.

Botulismo aviare

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 colinergiche, inducendo la classica sintomatologia caratterizzata da paralisi flaccida. In letteratura sono descritti episodi di botulismo aviare sostenuti 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. I tipi C e D riconoscono un mosaico di componenti comuni per le due neurotossine e per entrambi i tipi, 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).

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. 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). In alcuni paesi europei, negli ultimi 2 anni, si è registrato un aumento delle segnalazioni di botulismo negli allevamenti di broiler e tacchini ma senza che venga individuata una fonte precisa d'intossicazione.

Nel 2010 è stata osservata la comparsa di focolai di botulismo aviare in allevamenti commerciali di polli da carne. La patologia, che si è manifestata con la nota sintomatologia caratterizzata da paralisi flaccida dei muscoli del collo, alari, degli arti inferiori e infine di quelli respiratori, ha portato a mortalità molto elevate nei gruppi colpiti. La diagnosi di malattia è stata confermata sia tramite "mouse test" dal siero dei soggetti sintomatici che tramite l'evidenziazione della presenza di *C. botulinum* tipo C tramite PCR tipo-specifica ed esame colturale. Si sospetta che la fonte di contaminazione fossero alcune partite di lolla di riso utilizzata per la lettiera, anch'esse trovate positive per *C. botulinum* tipo C prima del loro utilizzo nei gruppi in cui la patologia si è presentata.

La malattia nel gruppo è stata contenuta tramite trattamenti farmacologici attivi verso batteri Gram positivi mentre l'eliminazione delle spore nei capannoni si è dimostrata alquanto difficoltosa. Infatti la malattia si è ripresentata puntualmente nei gruppi accasati nello stesso capannone in cui si era manifestato il primo focolaio nonostante la rimozione della lettiera e le ripetute operazioni di pulizia e disinfezione. Non siamo in grado di dire se tale malattia, come segnalato in altre paesi dell'UE, debba essere considerata in aumento in Italia. La costatazione di almeno 6 diversi focolai osservati nello stesso anno, quando in passato non era mai stata segnalata, suggerisce una particolare attenzione verso questa patologia.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

ISOLAMENTO DI *MYCOPLASMA MELEAGRIDIS* DA UN GRUPPO DI FARAONE (*NUMIDA MELEAGRIS*)

Bilato D., Gobbo F., Facco D., Brustolin M., Battanolli G., Catania S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD), Italy; scatania@izsvenezie.it

Summary

Mycoplasma meleagridis (MM) is considered a specific pathogen of turkeys and recently it has also been isolated in some free-ranging raptors in Germany. In turkeys it causes decreased egg hatchability, skeletal abnormalities and moderate fibrinous airsacculitis in juveniles.

MM experimental infections of turkey embryos, via yolk sac inoculation, produced high incidence of airsacculitis but with low mortality. The same challenge carried out in chicken embryos demonstrated MM replication without significant mortality. Adult chickens are refractory to infection with MM.

The egg route infection has been demonstrated for MM and for this reason MM control in poultry industry should be based mainly on the creation of MM-free breeders groups. In Italy, it is considered an "old" disease last reported more than 15 years ago. In fact, nowadays no specific control programme is applied in the poultry industry to avoid the entering of this pathogen.

During the late summer of 2010 some mortality cases were reported in an experimental breeding farm. The occurrence of such cases have been reported for about two months in a group of guinea fowls meant to be selected for reproduction groups.

The case history describes a group of animals which had never have good production performance and, in particular, poor growth.

Research for mycoplasmas showed the presence of MM in two subjects out of 8 animals examined.

This is the first report of isolation of MM in free range Guinea fowl (*Numida meleagris*) confirming the presence of *Mycoplasma meleagridis* in Italy.

INTRODUZIONE

Mycoplasma meleagridis (MM) è considerato un patogeno specifico del tacchino (1). In tale specie è causa di uno scarso accrescimento ed alterazioni scheletriche durante la fase giovanile, inoltre può essere causa di moderata aerosacculite di tipo fibrinoso. Uova provenienti da gruppi di riproduttori infetti possono presentare riduzione della schiudibilità (1).

Infezioni sperimentali hanno dimostrato un'alta incidenza di aerosacculite a seguito di inoculazione nel sacco vitellino di embrioni di tacchino, anche se raramente si è verificata la morte dell'embrione. L'inoculazione in uova embrionate di pollo ha prodotto la replicazione del patogeno senza però evidenziare mortalità embrionale. Infine infezioni sperimentali condotte su polli adulti hanno dimostrato una refrattarietà del pollo a tale patogeno.

Le ultime segnalazioni di questo patogeno riguardano l'isolamento di MM da trachee di alcuni rapaci selvatici in Germania, gli Autori della segnalazione ipotizzano che tali positività possano essere correlate all'infezione dei rapaci nelle grandi discariche

urbane (2) a dimostrazione del fatto della presenza del patogeno nel territorio europeo.

La trasmissione del MM avviene principalmente per via verticale. Tale peculiarità ha permesso di contenere e gestire la sua presenza nel comparto avicolo attraverso la creazione di gruppi MM *free*, tant'è che ormai tale patologia è considerata dalla maggior parte dei Medici Veterinari Aviani una patologia "vecchia" dato che le ultime segnalazioni risalgono a più di 15 anni fa. Per questi motivi attualmente non sono previsti specifici piani di controllo per tale patogeno.

Il presente lavoro descrive la prima segnalazione di isolamento di *Mycoplasma meleagridis* in un gruppo di faraone (*Numida meleagris*) e conferma la presenza nel territorio italiano di tale patogeno.

CASO CLINICO

Durante la tarda estate del 2010 presso un'azienda sperimentale per l'allevamento e la salvaguardia delle razze avicole venete si sono verificati alcuni casi di mortalità che si sono protratti per circa due mesi in un gruppo di faraone destinato alla formazione dei gruppi riproduttori per la stagione 2011.

L'anamnesi raccolta descriveva un gruppo di animali che non aveva mai presentato buone performance produttive, in particolare vi era stata una stentata crescita con soggetti manifestanti "ali ad elicottero" e continui scarti. Successivamente il problema si era fatto più manifesto con incremento della mortalità. I soggetti di tale gruppo erano schiusi ed erano stati allevati fino alla 4° settimana di vita congiuntamente ad un gruppo di tacchini che aveva presentato sintomatologia simile concomitante con la positivizzazione per Astrovirus. La continua presenza di tacchinotti con accrescimento stentato ha stimolato la ricerca del *Mycoplasma meleagridis* con successiva dimostrazione della presenza di tale patogeno.

MATERIALI E METODI

Alcuni animali, di circa 150 giorni di età, sono stati conferiti presso il nostro laboratorio dove sono stati sottoposti ad esame autoptico ed a ulteriori indagini diagnostiche. In seguito, sulla base dei rilievi anamnestici, dei risultati di laboratorio e sullo scarso miglioramento a seguito della terapia effettuata è stato ritenuto opportuno effettuare ulteriori prelievi in allevamento quali, 8 tamponi tracheali e cloacali, e 20 campioni di sangue-siero, per ricerca diretta ed indiretta dei micoplasmi.

I campioni sottoposti a ricerca micoplasmi sono stati stemperati in brodo (*Mycoplasma Experience*) ed incubati in atmosfera al 5% di CO₂ per almeno 15 giorni. I brodi sono stati valutati giornalmente al fine di evidenziare eventuale viraggio o intorbidimento, in tal caso o in alternativa allo scadere dei 15 giorni, questi venivano inoculati nel medesimo terreno agarizzato e incubati alle medesime condizioni. Le piastre (*Mycoplasma Experience*) sono state valutate giornalmente per evidenziare la presenza di eventuali colonie tipiche per 15 giorni, trascorsi i quali sono state considerate negative. In caso di crescita, si è proceduto alla identificazione di specie mediante metodica DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis). Successivamente si è proceduto al clonaggio al fine di poter effettuare una PCR 16S rDNA per *Mycoplasma spp.*, (3) il prodotto di tale amplificazione è stato sequenziato. La sequenza ottenuta è stata comparata con le sequenze presenti nel *database* del NCBI, permettendo l'identificazione di specie con una omologia del 100%.

Dai prelievi di sangue sono stati invece eseguiti esami per ricerca anticorpi da siero per *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum* in metodica Elisa mediante kit commerciale (IDEXX, Laboratories).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I soggetti conferiti presentavano uno scarso stato di nutrizione con scadente aspetto della livrea. L'esame necroscopico ha rilevato una gravissima ingluvite ed esofagite di tipo necrotico ascrivibile ad infestazione da *Capillaria spp.*. Sono stati rilevati inoltre piccoli depositi fibrinosi a carico dei sacchi aerei, quest'ultimi però non si presentavano ispessiti o vascolarizzati. Sulla base delle lesioni anatomopatologiche gli animali sono stati sottoposti a trattamento ripetuto (3 cicli) con levamisolo con miglioramento temporaneo e ricadute nell'arco di 7-10 giorni.

La ricerca per micoplasmi ha dimostrato la presenza di colonie ascrivibili a *Mycoplasma spp.*, solamente in due soggetti sul totale di 8 animali controllati. In tali animali colonie sospette sono state evidenziate da cloaca mentre nessuna crescita è stata dimostrata in trachea. Tale micoplasma è stato identificato come *Mycoplasma meleagridis* mediante metodica DGGE. Poiché tale specie di micoplasma è considerata specifica del tacchino, abbiamo ritenuto opportuno sequenziare il prodotto di amplificazione di un tratto genomico del 16S ottenendo una ulteriore conferma della identificazione. I campioni di sangue hanno mostrato negatività per MG e MS in ELISA in tutti i soggetti testati (n.20), mentre la ricerca anticorpi verso *Mycoplasma meleagridis* condotto con metodica ELISA ha mostrato reazione "dubbia" solamente in un solo soggetto. Gli animali positivi all'esame colturale sono risultati negativi all'esame sierologico, mentre il soggetto sierologicamente "dubbio" non era tra quelli sottoposti all'esame colturale.

Tali risultati ci permettono di segnalare l'isolamento di *Mycoplasma meleagridis* nella gallina faraona, che sembrerebbe dal punto di vista della sensibilità ai patogeni una specie molto prossima al tacchino come già peraltro dimostrato per altri patogeni specifici del tacchino (4).

Sicuramente il ruolo del *Mycoplasma meleagridis* nel settore gallina faraona dovrà essere maggiormente approfondito. La mancanza di test sierologici validati per questa specie impone l'uso abbinato dei test diagnostici diretti (isolamento, PCR) con quelli indiretti (SAR, Elisa).

BIBLIOGRAFIA

1. Chin R.P., Yan Ghazikhaniam G., and Kempf I. (2008). *Mycoplasma meleagridis* infection. Disease of Poultry 12 th Ed. 834-845
2. Lierz M., Schmidt R., Brunnberg L., and Runge M. (2000). Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from Free-ranging Birds of Prey in Germany. *J. Vet. Med.* 47: 63-67.
3. Johansson K. E., Heldtander M. U. K., Pettersson B. Characterization of Mycoplasmas by PCR and Sequence Analysis with Universal 16S rDNA Primers. *Mycoplasma Protocols*. Edited By Miles R., Nicholas R. Humana Press. 1998 145-165
4. Cattoli G, De Battisti C, Toffan A, Salviato A, Lavazza A, Cerioli M, Capua I. Co-circulation of distinct genetic lineages of astroviruses in turkeys and guinea fowl. *Arch Virol.* 2007;152(3):595-602.

EPISODIO DI DERMATOMIOSITE DA *ASPERGILLUS FUMIGATUS* NEL CAPPONE

Bonci M.¹, Carminato A.², Cesca A.³, Agnoletti F.¹, Drigo I.¹, Bano L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Istopatologia

³Medico Veterinario Libero Professionista

Summary

The present paper reports an outbreak of dermatomyositis caused by *Aspergillus fumigatus* infection of the subcutaneous tissues in a flock of 7,000 capons. At 60 days of age symptoms such as depression, ruffled feathers and lameness were observed in 0.5% of the birds. All the animals submitted to our laboratory showed serious and widespread dermatitis and myositis and the mycological examinations of the subcutaneous tissues revealed the presence of the fungus *Aspergillus fumigatus*. Castration, which took place 15 days before the outbreak, is likely to have been the origin of the infection.

Key words: capon, dermatomyositis, *Aspergillus fumigatus*

INTRODUZIONE

Aspergillus fumigatus è un fungo a diffusione cosmopolita e ubiquitario, può infatti essere isolato dal terreno, dalla vegetazione e dall'aria. La notevole capacità di sporulazione che lo caratterizza si traduce nella presenza di elevate concentrazioni di conidi nell'aria, sia in ambienti chiusi che all'aperto (Latgé, 2001). La capacità di tale fungo di provocare malattia è condizionata, sia negli animali che nell'uomo, dallo stato immunitario dell'ospite oltre che dalla carica infettante. Nei volatili, sia domestici che selvatici, l'aspergillosi può manifestarsi in forma acuta, in particolare negli animali giovani, con elevate morbilità e mortalità e in forma cronica, nei soggetti adulti. Tra le forme cliniche di aspergillosi descritte nelle specie aviari la principale è la forma polmonare, legata alla capacità dei conidi di *A. fumigatus* di raggiungere gli alveoli polmonari in virtù del loro ridotto diametro (2-3 µm); sono poi descritte forme oftalmiche, ossee, sistemiche (Richard, 1997) e Olias *et al.* (2010) hanno recentemente riportato un caso di aspergillosi articolare nel tacchino. Rare sono le segnalazioni di forme di dermatite associate ad *A. fumigatus*.

MATERIALI E METODI

Dati anamnestici

Nel mese di luglio del 2010, in un allevamento di 7000 capponi di 60 giorni d'età situato in Veneto, è comparsa una sindrome caratterizzata da abbattimento, arruffamento e alterazioni della deambulazione. La morbilità era all'incirca dello 0.5% e i soggetti colpiti presentavano un ritardo nell'accrescimento a cui conseguiva una certa disomogeneità del gruppo. Gli animali erano stati vaccinati nei confronti della malattia di Newcastle, della bronchite infettiva, della malattia di Marek e della malattia di Gumboro, erano stati sottoposti a capponatura chirurgica a 45 giorni di vita ed erano allevati su truciolo. Relativamente all'allevamento, il veterinario libero professionista riferiva un livello di igiene buono e un condizionamento ambientale

adeguato e non riferiva alcuna patologia pregressa nel gruppo.

Esame anatomopatologico, esami batteriologico e micologico.

L'esame anatomopatologico è stato eseguito su otto soggetti, di cui quattro conferiti morti e quattro conferiti ancora in vita. L'esame batteriologico è stato effettuato dal sottocute e dal fegato di tutti i soggetti utilizzando come terreni di coltura agar sangue addizionato con esulina e Eosin Methylen Blue agar, entrambi incubati a 37°C in condizioni di aerobiosi e Perfringens Agar Base e un'ulteriore piastra di agar sangue addizionato di esulina, incubati in condizioni di anaerobiosi. L'esame micologico è stato effettuato dal sottocute di tutti i soggetti utilizzando come terreno di coltura Sabouraud dextrose agar, poi incubato a 37°C in condizioni di aerobiosi.

Esame istopatologico

In sede autoptica sono stati prelevati campioni di cute/sottocute e di tessuto muscolare che sono stati immediatamente fissati in formalina tamponata al 10%, routinariamente processati e colorati con ematossilina eosina. Ulteriori sezioni sono state colorate con la metodica istochimica di impregnazione argentea (Grocott).

RISULTATI

All'esame anatomopatologico sono stati riscontrati in tutti i soggetti uno scadente stato di nutrizione e fragilità ossea. I soggetti conferiti vivi presentavano pneumoderma coinvolgente la cute delle pareti laterali del torace e dell'addome; nei soggetti conferiti morti la cute delle stesse regioni, pur non essendo più sollevata, appariva completamente scollata dai muscoli pettorali e dai muscoli del piatto interno della coscia. All'incisione e al sollevamento della cute dell'addome e del torace e alla disarticolazione dell'articolazione coxo-femorale si osservavano, a carico dei muscoli pettorali superficiali e dei muscoli del versante interno della coscia, lesioni di dimensioni comprese tra 2 e 15 mm, di forma rotondeggiante, talora confluenti, di colore bianco o bianco giallastro, rilevate, che al taglio presentavano un aspetto caseoso. Nei casi più gravi ed avanzati l'essudato appariva sottoforma di estese placche giallastre ed asciutte, ricoprenti interamente i muscoli, a carico delle quali era evidente, in alcuni punti, una patina grigio-verdastra. L'esame batteriologico dal sottocute ha evidenziato, in sette soggetti, la presenza di *Escherichia coli*; l'esame batteriologico eseguito dai fegati ha dato esito negativo, così come la ricerca di batteri anaerobi. L'esame micologico del sottocute ha evidenziato in tutti i soggetti, la presenza di numerose colonie che, in base all'aspetto e alle caratteristiche microscopiche (previa colorazione con blu lattofenolo), sono state identificate come *Aspergillus fumigatus*. All'esame istologico sono state evidenziate grave e diffusa dermatite e miosite purulento-necrotica associata a presenza di numerose ife fungine settate.

L'episodio si è esaurito nell'arco di una decina di giorni dalla comparsa dei sintomi con il decesso spontaneo e/o la soppressione degli animali colpiti e il gruppo è arrivato regolarmente alla macellazione, avvenuta dopo circa quattro mesi.

DISCUSSIONE

L'aspetto macroscopico e microscopico delle lesioni riscontrate e l'isolamento dal sottocute di tutti i soggetti conferiti di *A. fumigatus*, dimostrano il ruolo eziologico primario di tale fungo nella forma morbosa osservata e la presenza di *E. coli* quale germe di irruzione secondaria. Il fatto che l'episodio si sia manifestato un paio di

settimane dopo la castrazione consente di fare due ipotesi: che all'intervento sia seguita la contaminazione della soluzione di continuo ad opera delle spore del fungo verosimilmente presente nella lettiera come contaminante, oppure che le spore siano state veicolate dagli strumenti impiegati per la castrazione.

CONCLUSIONI

Il caso clinico esposto risulta particolarmente interessante per l'insolita localizzazione dell'infezione aspergillare e per l'estensione e la gravità delle lesioni osservate.

BIBLIOGRAFIA

1. Latgé J.P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 9(8): 382-389.
2. Olias P., Hauck R., Windhaus H., van der Grinten E., Gruber A.D., Hafez H.M. (2010). Articular aspergillosis of hip joints in turkeys. *Av. dis.* 54: 1098-1101.
3. Richard J.L. (2001). Aspergillosi. In: Calnek, *Patologia Aviaria* X Edizione – Edizione Italiana di Avian Pathology - Piccin Nuova Libreria S.P.A., Padova, pp. 391-401.

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI MICOPLASMI AVIARI MEDIANTE DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE)

Brustolin M., Battanolli G., Qualtieri K., Bilato D., Iob L., Catania S.,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD); scatania@izsvenezie.it

Summary

Mycoplasmas are important pathogens and commensal in the poultry industries and they are cause of considerable economical losses. *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) and *Mycoplasma iowae* (MI) are the most important causes of mycoplasmosis in the poultry worldwide but other species could infect avian species, especially in backyard flocks (which are generally less investigated than industrial farms).

In this short paper we would like to focus our attention on the use of Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE). This molecular technique is based on the different migration of amplicon under denaturing conditions in a polyacrylamide gel. The denaturing gradient results from the combination of “high temperature” and different concentration of urea and formamide in the gel.

Our study is focused on the 16S rDNA semi-conserved region, with a specific primer for the *Mollicutes*. Different Mycoplasmas pointed out unique patterns depending on the nucleotide composition and therefore the power needed to denature it during the electrophoretic run.

DGGE allows to obtain more information with a single analysis, such as the identification and characterization of single or multiple infections in the same animal and evidence of hypothetical new mycoplasma species.

Moreover the comparison between DGGE results and those obtained with other techniques (specific PCR, sequencing and IFAT) demonstrate that DGGE can be used as a useful tool in avian Mycoplasmosis diagnosis.

INTRODUZIONE

I micoplasmi, appartengono alla classe dei *Mollicutes*, rappresentano i più piccoli microorganismi in grado di replicare autonomamente. Il loro genoma può variare da 600 a più di 2000 Kb. Differiscono dagli altri batteri in particolare per le loro piccole dimensioni e per la totale assenza di parete cellulare. Sono ampiamente diffusi in natura e possono parassitare un'ampia varietà di specie viventi quali mammiferi, rettili, pesci, artropodi e piante (4).

Sono considerati “organismi difficili da coltivare” a causa delle loro esigenze metaboliche e dei loro lunghi tempi di crescita in vitro.

In campo aviario sono oltre 20 le specie conosciute, anche se solamente alcune rivestono un ruolo economicamente importante, quali *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma iowae* (MI), *Mycoplasma meleagridis* (MM).

Con l'introduzione delle metodologie biomolecolari la diagnostica per tali patogeni è nettamente migliorata, ma se da un lato sono stati ridotti i tempi di risposta, dall'altro è diminuita la possibilità di eseguire ulteriori indagini

di approfondimento tipiche della microbiologia classica, ancor'oggi effettuate normalmente per altri patogeni batterici di più semplice coltivazione. L'utilizzo della PCR per la ricerca di una specie di *Mycoplasma* (sono attualmente disponibili PCR specifiche solo per i patogeni di maggior interesse) risulta essere determinante se supportata da un corretto sospetto diagnostico, in tali casi permette di pervenire ad una corretta diagnosi. Però contestualmente la stessa metodica può essere inefficace in caso di errato sospetto di specie, ed inoltre impedisce la dimostrazione di eventuali coinfezioni, eliminando anche la possibilità di esecuzione di ulteriori indagini sul ceppo isolato.

Attualmente nell'isolamento dei micoplasmi aviari il manuale OIE prevede un'incubazione in brodo fino a due settimane seguite da altre due settimane per l'eventuale crescita in agar. Poiché i micoplasmi non sono distinguibili su base biochimica risulta necessario eseguire metodiche aggiuntive per l'identificazione della specie isolata quali l'immunofluorescenza, l'inibizione della crescita, l'utilizzo di PCR specie specifiche che naturalmente aumentano ancor di più i tempi di risposta.

La DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) è una tecnica elettroforetica che permette di separare degli amplificati in base alla loro sequenza e non al loro peso molecolare. Il limite teorico di tale tecnica è quello di identificare fino ad una singola mutazione puntiforme (2). Il principio si basa sulla diversa mobilità di una doppia elica parzialmente denaturata in un supporto solido, la denaturazione stessa dipende a sua volta dalla sequenza nucleotidica. A tale riguardo è opportuno ricordare che l'appaiamento delle basi GC si basa su 3 legami idrogeno molto più stabili del doppio legame idrogeno presente tra le basi AT. Su tali presupposti alcuni Autori hanno effettuato studi di comparazione della migrazione di un tratto del 16S rDNA, regione conservata dei batteri (3). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare su isolati di campo l'applicabilità della metodica DGGE, quale potenziale metodo per l'identificazione di differenti specie di micoplasmi,.

MATERIALI E METODI

I campioni pervenuti presso il nostro laboratorio sono stati sottoposti ad isolamento per micoplasmi mediante l'utilizzo di terreno "*Mycoplasma Experience*" sia in brodo, sia in agar. Brevemente, i brodi vengono incubati a 37°C al 5% CO₂ e valutati giornalmente per variazioni di pH e torbidità. Nel caso si verifichi una variazione, o allo scadere delle 2 settimane di incubazione, i brodi vengono seminati nel medium agarizzato per la valutazione della presenza di colonie. La via microbiologica classica procede con la valutazione della presenza di colonie più o meno tipiche in agar e l'eventuale conservazione del ceppo, le colonie sospette vengono identificate attraverso l'immunofluorescenza, PCR specifiche oppure tramite sequenziamento del tratto conservato 16S rDNA (1).

La nostra metodica DGGE prevede, in caso di presenza di colonie sospette, un'estrazione del DNA con kit commerciale *GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma-Aldrich, St.Louis MO) direttamente dal brodo di coltura.

L'acido nucleico viene amplificato mediante PCR, il cui target è un tratto codificante per il 16S rRNA. Si utilizza un forward primer universale batterico addizionato di una quarantina di GC necessarie quale ancora per la successiva

corsa elettroforetica, e un reverse primer specifico per la classe dei *Mollicutes*. (2,3)

Gli amplificati vengono sottoposti ad una elettroforesi a 60°C per 17 ore con una differenza di potenziale di 200V su un supporto di poliacrilammide a concentrazione uniforme ma con un gradiente di concentrazione di urea e formamide.

Per la lettura dei risultati è necessario utilizzare dei controlli positivi (ceppi di riferimento) che fungono da pattern di paragone.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale 738 campioni di specie aviare sono stati analizzati con metodica microbiologica classica per ricerca micoplasmi. In particolare 621 campioni provenivano da specie quali pollo, tacchino e gallina faraona, 53 campioni da specie “minori” quali fagiano, starna, anatra, struzzo ed infine 64 provenienti da specie avicole di nicchia quali galliformi, columbiformi, falconiformi, passeriformi. Della totalità dei campioni conferiti 188 hanno mostrato positività per *Mycoplasma spp.*. In particolare 172 campioni positivi appartenevano a specie quali il pollo, il tacchino e la faraona, 10 campioni positivi sono stati dimostrati negli avicoli definiti minori ed infine 6 positività nelle specie di nicchia.

Per quanto riguarda i campioni provenienti dalle specie pollo, tacchino e faraona, le positività rilevate sono ascrivibili nella maggioranza dei casi a *Mycoplasma synoviae* con 106 isolamenti ed al *Mycoplasma gallisepticum* con 39 isolamenti, di particolare interesse risultano essere le 7 positività evidenziante per *Mycoplasma meleagridis*. Altre specie di micoplasmi evidenziate nella specie pollo sono state il *Mycoplasma iners*, il *Mycoplasma gallinarum* ed il *Mycoplasma gallinaceum*. Inoltre, da altre specie avicole, sono stati isolati ed identificati ulteriori specie di micoplasma quali il *M. columborale*, *M. glycyphilum*, *M. buteonis*.

Per quanto riguarda l'identificazione di specie, la metodica DGGE ha costantemente confermato i risultati delle metodiche di riferimento utilizzate. Inoltre ha permesso una corretta identificazione delle specie coinvolte in alcuni specifici casi di coinfezioni.

Dai risultati da noi ottenuti possiamo affermare che la metodica DGGE può essere utilizzata quale tecnica per l'identificazione di specie del genere *Mycoplasma* in campioni di campo provenienti da allevamenti avicoli sottoposti a ricerca micoplasmi con metodica microbiologica. La scelta di affiancare la metodica microbiologica classica alla biologia molecolare risulta essere un buon compromesso sia in termini di tempo che di specificità. Infatti la sua versatilità permette di identificare in un'unica amplificazione la presenza di diverse specie di micoplasma, comprese quelle considerate “minori” e per cui non si hanno ad oggi PCR specifiche, nonché di infezioni miste, solitamente non identificate a causa della specificità delle metodiche biomolecolari normalmente utilizzate. Va ricordato infine che tale metodica essendo intrinsecamente basata su di una metodica microbiologica permette di rilevare solo organismi vitali nel terreno di coltura utilizzato per l'isolamento consentendo inoltre ulteriori approfondimenti diagnostici sul ceppo isolato.

BIBLIOGRAFIA

1. Johansson K. E., Heldtander M. U. K., Pettersson B. Characterization of Mycoplasmas by PCR and Sequence Analysis with Universal 16S rDNA Primers. *Mycoplasma Protocols*. Edited By Miles R., Nicholas R. Humana Press. 1998 145-165.
2. McAuliffe L, Ellis R. J., Ayling R. D., Nicholas R. A. Differentiation of Mycoplasma species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 41, 4844-4847.
3. McAuliffe L., Ellis R. J., Lawes J. R., Ayling R. D., Nicholas R. A. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for the detecting and differentiating mycoplasma species. *Journal of Medical Microbiology*. 2005 54,731-739.
4. Razin S., 1992 *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American society for microbiology.

STABILITÀ DEL GENE *FLAA* IN *CAMPYLOBACTER COLI*

Caroli A.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Pazzani C.², Camarda A.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia.

²Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia.

Summary

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* usually colonize avian gut, and they can also grow in human intestine. Some Author hypothesized that the ability of *Campylobacter* spp. to colonize different environments may be improved by genetic variability. The genes *flaA* and *flaB*, involved in the synthesis of flagellin, are associated with a variable region of *Campylobacter* spp. genome. We investigated the genetic stability of the locus *flaA* in *C. coli* by repeatedly passaging two strains of *C. coli* *in vitro* and by PCR-RFLP typing them. Furthermore we sequenced PCR products from initial and final passages to better identify possible single nucleotide variations. We did not find any change in PCR-RFLP profiles and sequence analysis revealed only point mutations, but their frequencies were different in the two strains. On aggregate those preliminary results suggest that some strains are more prone than other to genetic variability.

INTRODUZIONE

Campylobacter (C.) jejuni e *C. coli* sono i principali responsabili di gastroenteriti batteriche nei paesi industrializzati (Bluzler, 2004). Alcuni Autori hanno ipotizzato che la capacità di colonizzazione dell'intestino di questi germi possa essere associata ad una loro propensione alla variabilità genetica, che conferirebbe maggiori probabilità di sopravvivenza (Ridley et al., 2008). Tra i fattori coinvolti nei meccanismi di virulenza è certamente inclusa la flagellina in quanto promotore della colonizzazione intestinale. Due geni, *flaA* e *flaB*, sono coinvolti nella biosintesi della flagellina, ed essi ricadono all'interno di regioni omopolimeriche con alto tasso di variabilità (Parkhill et al., 2000). I due geni condividono il 95% della sequenza nucleotidica, ma *flaA* sembra essere critico per la mobilità, la colonizzazione, e la patogenesi, mentre *flaB* potrebbe avere il ruolo di riserva di materiale genetico. Eventi ricombinativi tra *flaA* e *flaB* incrementano la variabilità della flagellina, e non è escluso che ciò possa influire sull'adattamento ai diversi ambienti intestinali.

In questo studio è stata valutata *in vitro* la variabilità del gene *flaA* di ceppi di *C. coli* coltivati mediante passaggi sequenziali in condizioni ambientali differenti.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 2 stipiti di *C. coli* (rispettivamente C19 e C29) isolati da 2 allevamenti di galline ovaiole della Puglia. I 2 stipiti, che presentavano differente profilo di restrizione (C2 e C1) (Nachamkim et al. 1993) sono stati ripassati circa 50 volte in microaerofilia su Nutrient Agar (Oxoid, Milano) addizionato di sangue di montone defibrinato (C_f 5%). Parallelamente, i due ceppi sono stati sottocoltivati, in due esperimenti separati, in presenza di 1x10⁶ UFC di *Salmonella enterica* subsp.

enterica ser. Gallinarum (*S. Gallinarum*), addizionate per inclusione in Agar sangue. Ad ogni sottopassaggio di ciascuna serie, il ceppo è stato caratterizzato mediante PCR-RFLP (Nachamkim et al. 1993). I prodotti di amplificazione relativi al locus *flaA* provenienti dalla prima tipizzazione e dall'ultima sottocoltura sono stati clonati in pGEM-T-Easy Vector (Promega, Milano) secondo le indicazioni del produttore. Tre cloni relativi alla prima tipizzazione e dodici dagli ultimi passaggi di ciascuna serie sono stati sequenziati (BMR Genomics, Padova). Le sequenze sono state confrontate sia tra loro per multiallineamento mediante software Mega 4.1 (Tamura et al., 2007), sia con quelle depositate in GenBank mediante l'applicazione BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RISULTATI

I profili di PCR-RFLP caratterizzanti i ceppi di *C. coli* ad ogni singolo passaggio, in presenza e in assenza del competitore *S. Gallinarum*, sono rimasti invariati.

I risultati emersi dai sequenziamenti delle porzioni genetiche clonate ed amplificate in corripodenza del primo ed ultimo passaggio sono stati riepilogati in Tabella 1. La sequenza di tutti i cloni relativi all'ultimo passaggio del ceppo C19 era la medesima, mentre dopo i passaggi sequenziali in presenza di *S. Gallinarum* sono stati evidenziati due distinti gruppi di sequenze. Due gruppi distinti sono stati ottenuti anche dai cloni relativi all'ultimo passaggio del ceppo C29, sia in presenza sia in assenza del competitore.

Le sequenze dei passaggi finali con quelle iniziali differivano solo per mutazioni puntiformi. Inoltre, confrontando le sequenze di *flaA* clonate con sequenze depositate in GenBank relative allo stesso gene e al paralogo *flaB* è stato possibile escludere la possibilità che siano intercorsi eventi di ricombinazione.

Mentre le sequenze iniziali e finali del ceppo C19 differivano soltanto per un nucleotide, le sequenze del ceppo C29 variavano per un numero di mutazioni compreso tra due e cinque, con il numero più alto di alterazioni osservato in presenza del competitore.

Nel complesso, assumendo approssimativamente 10-15 generazioni per passaggio, è stato possibile stimare un tasso di mutazione puntiforme compreso tra 3×10^{-6} e 4×10^{-7} per il ceppo C29, e un tasso non superiore a 10^{-7} per il ceppo C19.

DISCUSSIONI

Il numero esiguo di sostituzioni non consente un'analisi statistica accurata, ma le frequenze di mutazione del locus *flaA* in entrambi i ceppi di *C. coli*, sono più elevate se comparate con il tasso di mutazione standard presunto per *Escherichia coli*, compreso tra 10^{-10} - 10^{-11} .

Inoltre, lo stress da competizione sembra favorire la variabilità genetica. Infatti, il ceppo C29 mostra una maggiore tendenza alla mutazione in un numero minore di passaggi in presenza del competitore *S. Gallinarum*.

Il ceppo C19, invece, in condizioni di stress da competizione mostra un tasso di mutazione inferiore rispetto al ceppo C29, mentre non sono state individuate sequenze mutanti nello stesso ceppo sottocoltivato in condizioni ottimali, e questo potrebbe implicare una maggiore propensione di alcuni ceppi alla variabilità rispetto ad altri della stessa specie, così come riportato per *C. jejuni* (Hanninen et al., 1999).

Resta da valutare se questo diverso comportamento sia una caratteristica del locus

fla oppure se non sia una peculiarità dell'intero genoma della specie, considerato che la variabilità genetica può favorire la sopravvivenza del *Campylobacter* spp. Poiché la variabilità genetica può favorire la colonizzazione dell'ambiente intestinale, si potrebbe ipotizzare che alcuni genotipi di *Campylobacter* spp. possano essere a loro volta favoriti durante il processo di colonizzazione da una maggiore tendenza alla variabilità. A seguito delle indagini preliminari qui presentate, saranno rivolti in futuro studi atti a verificare queste ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Butzler, J.P., 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, 10:868-876.
2. Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P., 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:406-410.
3. Hanninen M.L., Hakkinen, M., Rautelin, H., 1999. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microb.*, 65:2272-2275.
4. Havelaar A.H., Mangen, M.J.J., de Koeijer, A.A., Bogaardt, M.J., Evers, E.G., Jacobs-Reitsma, W.F., van Pelt, W., Wagenaar, J.A., de Wit, G.A., van der Zee, H., Nauta, M.J. 2007. Effectiveness and Efficiency of Controlling *Campylobacter* on Broiler Chicken Meat. *Risk Anal.* 27:831-844.
5. Nachamkin, I., Bohachick K., Patton.C.M. 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:1531-1536.
6. Parkhill, J., Wren, B.N., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H.M., Whitehead, S., Barrell, B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403:665-668.
7. Ridley, A.M., Toszeghy, M.J., Cawthraw, S.A., Wassenaar, T.M., Newell, D.G.. 2008. Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine. *J. Appl. Microbiol.* 105:95-104.
8. Tamura, K., Dudley, J., Nei M., Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
9. Wilson D.J., Gabriel E., Leatherbarrow A.J.H., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E., Fox A., Fearnhead P., Hart C.A., Diggle P.J. 2008. Tracing the source of *Campylobacteriosis*. *Plos Genetics*, 4:e1000203.

Tabella 1. Risultati del confronto tra le sequenze nucleotidiche. I dati sono relativi al confronto tra le sequenze dell'ultimo passaggio rispetto alla sequenza del ceppo originario.

Sequenza ¹	Sostituzioni	Gap	Transizioni	Trasversioni	Sostituzioni Sinonime
19(43)	0	0	0	0	0
19(50S)a ²	1	0	1 (T→C)	0	1
19(50S)b ²	1	1	1 (T→C)	0	1
29(44)a	2	0	2 (C→T)	0	0
29(44)b	1	0	1 (C→T)	0	0
29(30S)a ²	5	0	1 (G→A) 2 (A→G) 1 (T→C) 1 (C→T)	0	3
29(30S)b ²	2	0	1 (T→C) 1 (C→T)	0	1

¹ Nome della sequenza riferita al ceppo specifico (C19 o C29), riportato in parentesi il numero del passaggio da cui si è ottenuta la sequenza.

²S: *C. coli* cresciuto in presenza di *S. Gallinarum*.

VALUTAZIONE DEL LIVELLO DI CONTAMINAZIONE BATTERICA IN UOVA ED EMBRIONI DI POLLO PRESSO UN INCUBATOIO INDUSTRIALE

Casadio M.¹, Massi P.², Tosi G.², Fiorentini L.², Taddei R.², Bolognesi P.G.³, Catelli E.³

¹ *Medico Veterinario - Russi (RA).*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Forlì.*

³ *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Ozzano Emilia (BO).*

Summary

Infectious problems are a constant threat to the poultry industry. The hatchery represents a critical point in this respect. It combines all the conditions (temperature, moisture and organic matters) allowing the development of several pathogens that can affect the chicks health and performances. The present study aims to measure and identify bacterial contaminations in different sites within a broiler hatchery.

INTRODUZIONE

Le malattie batteriche continuano a provocare rilevanti perdite economiche nella produzione avicola industriale. Carenze igienico-sanitarie a livello di allevamento si amplificano in maniera esponenziale nell'incubatoio. I fornitori delle uova giocano pertanto un ruolo chiave a tale riguardo. A ciò si aggiunge l'effetto amplificatore dell'incubatoio. La moltiplicazione batterica viene infatti favorita dalle condizioni fisico-chimiche dell'incubazione, condizioni che esaltano la natura di "pabulum ottimale" per il loro sviluppo che è l'uovo. Nella fase di schiusa ciò è favorito oltre che da umidità elevata e calore, anche dalla presenza di materiale organico (meconio, piumino e gusci) e dalla ventilazione vorticoso. La popolazione microbica presente in incubatoio viene trasferita tramite i pulcini all'allevamento di destinazione. Si può quindi ritenere che l'allevamento dei riproduttori, l'incubatoio e l'allevamento di destinazione, pur essendo geograficamente distanti tra loro, siano strettamente correlati dal punto di vista microbiologico (Barnes et al., 1980).

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il grado di inquinamento batterico di uova di pollo nelle diverse fasi dell'incubazione, dall'arrivo alla schiusa, in un incubatoio industriale.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento delle uova è stato effettuato presso un incubatoio della Romagna. Questa azienda incuba esclusivamente uova di polli da carne. La sua capacità produttiva è di circa 1.280.000 uova, mentre la produzione settimanale è di circa 320.000 pulcini. Vengono utilizzate incubatrici a caricamento continuo. Il campionamento è stato effettuato nel periodo agosto-ottobre, raccogliendo in totale 1200 uova di diversa provenienza (italiana ed estera). Presso l'incubatoio, nei giorni dell'arrivo (bi-settimanale) sono state prelevate 20 uova tenendole distinte per fornitore e scegliendole tra le più sporche. Il campionamento è stato eseguito al momento dell'arrivo dei

camion, durante lo scarico.

Sono state campionate 20 partite di uova in arrivo e queste ultime sono state seguite fino alla schiusa. Dopo la schiusa, da ciascuna partita campionata all'arrivo venivano prelevate 40 uova: 20 non schiuse con guscio integro ed altre 20 non schiuse con guscio parzialmente beccato.

Prove di laboratorio

Le 20 uova in arrivo per ogni fornitore, suddivise in 2 pool da 10 uova ciascuno, venivano sottoposte a lavaggio del guscio per le seguenti determinazioni: *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ed altre specie batteriche eventualmente presenti.

Dopo il lavaggio le stesse uova venivano prese in esame singolarmente per analizzarne il tuorlo per la ricerca di *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ed altre specie batteriche eventualmente presenti. Il tuorlo veniva poi analizzato in pool (rispettando l'ordine di quelli fatti per i gusci) per ricercare *Salmonella spp.* Dopo la schiusa sono state campionate 20 uova (non schiuse e beccate) e altre 20 (non beccate). Solo queste ultime venivano suddivise in due pool da 10 uova ciascuno e sottoposte al lavaggio del guscio per le seguenti determinazioni: *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ed altre specie batteriche eventualmente presenti. Dopo il lavaggio, le stesse uova venivano prese in esame singolarmente, per la determinazione di *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ed altre specie batteriche eventualmente presenti nel sacco vitellino. Quest'ultimo procedimento veniva ripetuto sulle uova beccate. Per la ricerca di *Salmonella spp.* è stato applicato il metodo ISO 6579:2002/AMD1:2007 che prevede le seguenti fasi: pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo (acqua peptonata tamponata) e incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ± 2 ore; arricchimento in terreno selettivo semisolido (MSRV) e incubazione a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24-48 ore; isolamento su piastra (XLD agar e BGA) e incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 3 ore; prove di identificazione biochimica e sierologica. Per la ricerca di *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* veniva eseguita una semina diretta su Hektoen Enteric Agar (incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24-48 ore).

RISULTATI

I risultati della prove sono riassunti nei grafici 1, 2, 3 e 4. Ricerca *Salmonella spp.*: *Salmonella livingstone* veniva isolata dal sacco vitellino di due pool (su 40 analizzati) di uova non schiuse beccate.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La ricerca, condotta su 20 partite di uova da cova, di diversa provenienza, seguite dall'arrivo in incubatoio sino alla schiusa, ha evidenziato una prevalenza di *Enterobacteriaceae* e, tra queste, principalmente di *Escherichia coli*. Quest'ultimo è stato isolato nel 3% dei tuorli, nel 22% dei sacchi vitellini delle uova non beccate e nel 88% di quelle beccate. Questi risultati confermano il ruolo di *Escherichia coli* come principale contaminante batterico dell'incubatoio (Chmielowiec-Korzeniowska *et al.*, 2007). I risultati della presente indagine riportano percentuali piuttosto elevate se paragonate con dati analoghi presenti in bibliografia (Reid *et al.*, 1961) che segnalano una prevalenza di *E. coli* in embrioni morti del 19%.

Altri batteri appartenenti alle *Enterobacteriaceae* sono stati isolati in percentuale inferiore rispetto a *E. coli* e quasi sempre associati ad esso. In particolare sono

stati isolati: *Salmonella livingstone*, *Citrobacter spp.* (*C. koseri*, *C. amalonaticus*), *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens* e *Providencia alcalifaciens*.

In questa ricerca è stata isolata *Salmonella livingstone* in 2 pool di sacchi vitellini prelevati da uova beccate. Si tratta di un sierotipo di *Salmonella spp.* considerato di minore importanza patogena e, per questo motivo, non considerato nei piani di controllo dell'infezione da *Salmonella spp.* attualmente in vigore nel nostro paese nelle differenti tipologie di produzione avicola. Il riscontro di salmonelle cosiddette "minori" e, soprattutto, la loro persistenza nel tempo nell'incubatoio può tuttavia rappresentare un importante indicatore di contaminazione ambientale, rendendo così necessaria l'implementazione delle misure di biosicurezza.

Pseudomonas aeruginosa è stato isolato nella misura dell'1% nei tuorli e del 4% nei sacchi vitellini delle uova beccate (di cui il 3,5% associato a *E. coli*). La contaminazione dovuta a questo batterio, al momento della schiusa, è risultata quindi scarsa se paragonata ai pochi lavori pubblicati in merito. Ad esempio Reid *et al.* (1961), infatti, esaminando 189 embrioni morti, hanno riscontrato la presenza di *Pseudomonas spp.* nel 6,87% di essi, mentre Barbour *et al.* (1985), esaminando 111 embrioni morti, hanno isolato *Pseudomonas spp.* nel 14,4% di essi. E' da rilevare come l'incubatoio possa esercitare un effetto amplificatore della contaminazione batterica. Dai risultati dello studio emerge infatti un incremento dell'infezione da *Escherichia coli*, nel periodo "arrivo-schiusa" dal 10 al 100% e da *Pseudomonas aeruginosa* dal 5 al 15%. L'infezione del sacco vitellino (onfalite) e, nei casi più gravi, la diffusione setticemica può causare perdite rilevanti nei primi giorni di vita del pulcino.

Sphingomonas paucimobilis è stato isolato dal guscio delle uova in arrivo provenienti dal Portogallo, ma non alla schiusa. Ryan ed Adley (2010) riportano che questo batterio è stato isolato da acqua potabile e da campioni biologici umani.

Acinetobacter spp. (*A. calcoaceticus* e *A. lwoffii*) sono stati isolati alla schiusa, nell'1% delle uova non beccate e nel 3% di quelle beccate (di cui il 2% associato ad *E. coli*). Tali specie batteriche possono, sia pure raramente, provocare infezioni nel pollame adulto (Kaya *et al.*, 1989; Erganis *et al.*, 1988) con possibile localizzazione all'apparato riproduttore femminile (nel caso di *A. calcoaceticus*).

I risultati dello studio confermano come l'igiene dell'incubatoio e, in particolare, delle camere di schiusa rappresenti un fattore-chiave nella prevenzione delle principali infezioni batteriche del primo periodo di vita del pulcino.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbour E.K., Nabbut N.H., Hanners S.W., Al-Nakhli H.M., 1985. *Reduction of bacterial infections in newly hatched chicks by the use of antimicrobial dips: preliminary approaches*. Veterinary Quarterly, 7(1):39-43.
2. Barnes E.M., Impey C.S., Cooper D.M., 1980. *Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick*. The American Journal of Clinical Nutrition, 33:2426-2433.
3. Chmielowiec-Korzeniowska A., Tymczyzna L., Skòrska C., Sitkowska J., Cholewa G., Dutkiewicz J., 2007. *Efficacy of a novel biofilter in hatchery sanitation : I. Removal of airborne bacteria, dust and endotoxin*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 14(1):141-150.
4. Erganis O., Corlu M., Kaya O., Ates M., 1988. *Isolation of Acinetobacter*

- calcoaceticus* from septicemic hens. Veterinary Records, **123**(14):374.
5. Kaya O., Ates M., Erganis O., Corlu M., Sanlioglu S., 1989. *Isolation of Acinetobacter lwoffii* from hens with septicemia. Journal of veterinary medicine B, **36**:157-158.
 6. Reid W. M., Maag T.A., Boyd F. M., Kleckner A.L., Schmittle S.C., 1961. *Embryo and baby chick mortality induced by a strain of Escherichia coli*. Poultry Science, **40**:1497-1502.
 7. Ryan M.P., Adley C.C., 2010. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. The Journal of Hospital Infection, **75**(3):153-157.

Grafico 1. Risultati prove batteriologiche su uova in arrivo: lavaggio gusci (40 pool da 10 uova ciascuno).

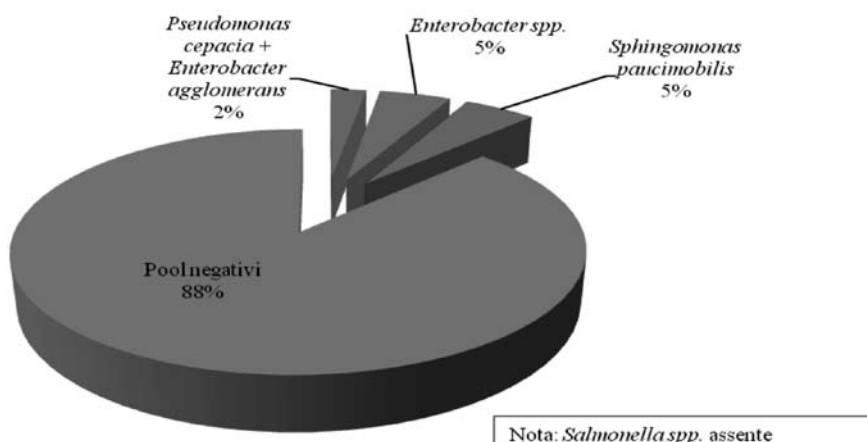


Grafico 2. Risultati prove batteriologiche su uova in arrivo: tuorlo (400 uova).

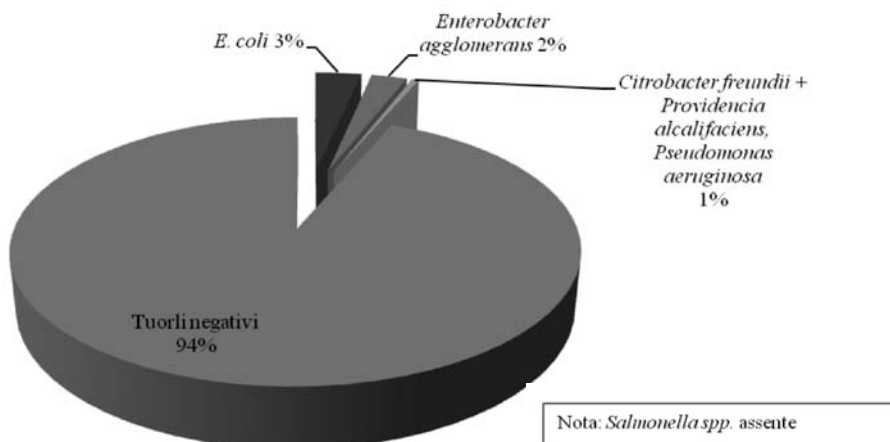


Grafico 3. Risultati prove batteriologiche dal sacco vitellino di uova non schiuse e non beccate (400 uova).

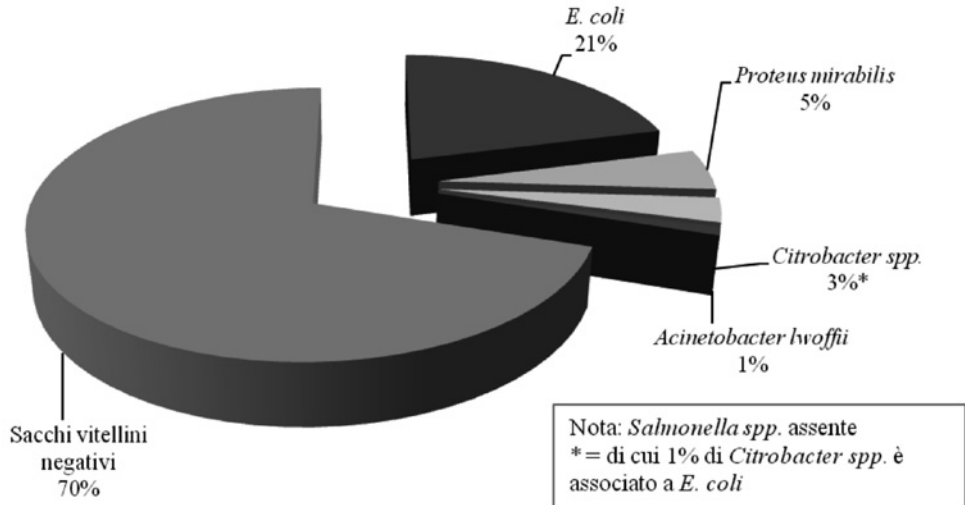
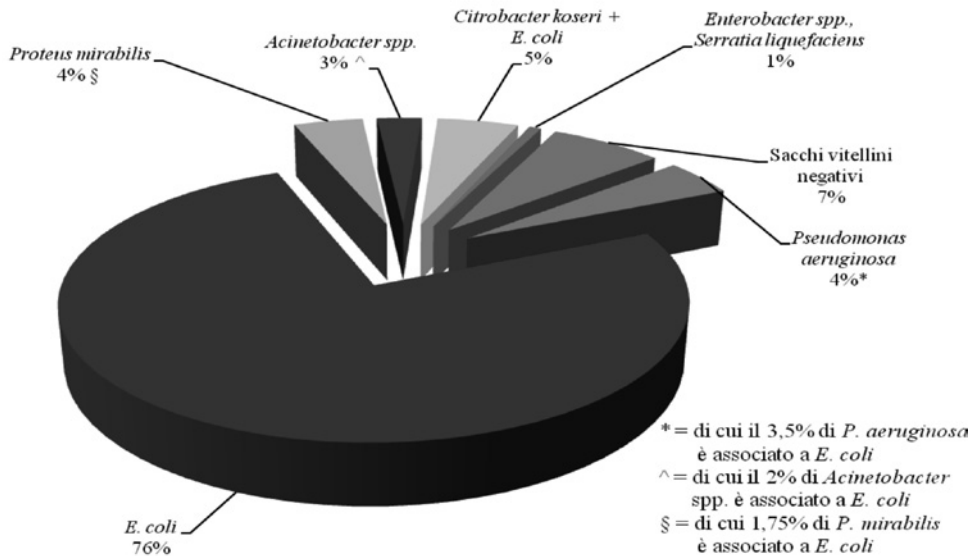


Grafico 4. Risultati prove batteriologiche dal sacco vitellino di uova non schiuse beccate (400 uova).



INFEZIONE SPERIMENTALE IN GALLINE OVAIOLE SPF CON DUE DIFFERENTI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* DENOMINATI PASC8 E TRACH: RISULTATI PRELIMINARI.

Catania S., Bilato D., Gobbo F., Brustolin M., Battanoli G., Beato M.S., Iob L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD); scatania@izsvenezie.it

Summary

Mycoplasma synoviae (MS) is considered worldwide an important pathogen of poultry industry. It is mainly observed in meat poultry production where it is responsible of respiratory and articular diseases. On the contrary its role in hen layers is still subject of debate. Recently some authors have described a new and specific lesion on the top of the eggs, classified as Eggshell Apex Abnormalities (EAA). The same authors have correlated these lesions to oviductal infection with MS. The analysis of *vlhA* gene of the strain isolated from oviducts (PASC8-strain) showed some differences if compared to the strain isolated from trachea (TRACH-strain). Such differences may be responsible for the different tissue tropism of these strains.

The aim of this study was to reproduce MS infection, via intratracheal inoculum, under controlled conditions in SPF White Leghorn chickens in order to clarify any correlation between strains, tissue tropism and presence of abnormal eggs. Our preliminary results showed a presence of abnormal eggs only in the group challenged with PASC8 strain.

INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma synoviae* (MS) è considerato uno tra i più importanti micoplasmi patogeni per il settore avicolo industriale. Il suo ruolo patogeno è stato ampiamente dimostrato in particolare nel settore da carne dove provoca, sia nel pollo che nel tacchino, forme respiratorie con interessamento anche articolare. Nel settore della gallina ovaiole tale micoplasma non è stato mai considerato un patogeno di rilevante importanza, infatti il suo ruolo come patogeno risulta essere ancora oggetto di dibattito. Recentemente alcuni Autori (1;2) hanno correlato la presenza del *Mycoplasma synoviae* ad una caratteristica alterazione del polo apicale del guscio, comunemente conosciuta come EAA (*Eggshell Apex Abnormalities*) o uova a guscio di vetro. Studi condotti sul gene *vlhA* hanno correlato uno specifico ceppo di MS, denominato PASC8, alle lesioni del guscio, permettendo inoltre di ipotizzare un maggiore tropismo di tale ceppo per l'ovidutto nei confronti di un ceppo di MS, denominato TRACH, e isolato dalle trachee degli animali nel medesimo allevamento (3,4;5).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di dimostrare attraverso una infezione sperimentale con i due differenti ceppi di *Mycoplasma synoviae* (PASC8 e TRACH) l'eventuale correlazione tra ceppo, presenza di MS a livello oviduttale e produzione di uova alterate .

MATERIALI E METODI

Un gruppo di 15 animali SPF (*White Leghorn*) di 16 settimane di vita sono stati suddivisi casualmente in tre gruppi da 5 soggetti, e introdotti in tre isolatori BL3 differenti. Dopo due settimane di adattamento alle condizioni sperimentali gli animali sono stati infettati

con 1 ml di brodo coltura per via intratracheale. I tre gruppi sono stati così suddivisi: un gruppo di controllo, un gruppo denominato PASC8 ed infine un gruppo denominato TRACH. L'inoculo era costituito da brodo coltura sterile per il gruppo controllo, da brodo coltura titolata 1.5×10^6 UCC/ml di *Mycoplasma synoviae* ceppo PASC8 per il gruppo PASC8, e da brodo coltura titolata 1.75×10^7 UCC/ml di *Mycoplasma synoviae* ceppo TRACH per il gruppo TRACH.

Gli animali sono stati monitorati a cadenze prestabilite al fine di verificare la sieroconversione mediante metodica SAR ed ELISA, ed attraverso l'esecuzione di tamponi tracheali per evidenziare *Mycoplasma synoviae* mediante PCR specifica. Le uova prodotte sono state raccolte giornalmente, pesate, ed osservate macroscopicamente al fine di evidenziare eventuali lesioni. Gli animali sono stati stabulati per 8 settimane dopo l'infezione e allo scadere di questo periodo sono stati sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico. Durante tale esame sono stati prelevati differenti campioni, in particolare sono stati prelevati tamponi da trachea, polmone ed ovidutto per la ricerca di *Mycoplasma synoviae* mediante PCR.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I soggetti del gruppo di controllo durante tutto il periodo della sperimentazione non hanno presentato positività per *Mycoplasma synoviae* né sierologica né mediante PCR.

Due soggetti del gruppo PASC8 hanno presentato positività per MS mediante ELISA già al 5° giorno post-infezione (PI), mentre la totalità dei soggetti ha presentato positività per MS sia in SAR che in ELISA al 7° giorno PI. Inoltre, i tamponi tracheali sono risultati positivi in PCR per MS per tutto il periodo della prova.

Nel gruppo TRACH al 5° giorno PI solamente un soggetto ha manifestato positività per MS mediante SAR, mentre nessuna positività in ELISA è stata evidenziata. Al 7° giorno PI tutti i soggetti hanno manifestato sieroconversione, sia in SAR che in ELISA. Anche in questo gruppo è stato possibile dimostrare la presenza di MS a livello tracheale mediante PCR per tutta la durata della prova.

Solamente il gruppo PASC8 ha mostrato alterazione apicale del guscio in 13 uova, pari al 7.3% di quelle prodotte nelle 8 settimane post infezione. Tale alterazione era rappresentata da un'area di maggiore rugosità con margini regolari di circa 2 centimetri di diametro, a livello della porzione apicale dell'uovo. Tuttavia la colorazione delle uova non è sembrata essere alterata, anche se dobbiamo considerare che la linea genetica utilizzata per questo studio produce uova a guscio bianco. Rispetto alle lesioni rilevate nelle galline ovaiole in campo, le lesioni evidenziate in queste prove sperimentali sono state meno evidenti, forse anche a causa della linea genetica degli animali utilizzata per la prova.

I risultati degli esami effettuati sugli animali deceduti durante la prova o sacrificati alla fine della stessa, hanno dimostrato positività per *Mycoplasma synoviae* a livello oviduttale solamente in due soggetti, entrambi appartenenti al gruppo PASC8. L'analisi del gene *vIhA* ha dimostrato la loro identità al ceppo PASC8 utilizzato per la infezione sperimentale.

I dati preliminari fin qui riportati sembrerebbero confermare l'ipotesi iniziale in cui si supponeva che le alterazioni apicali del guscio fossero correlate ad un ceppo specifico di *Mycoplasma synoviae* con particolare tropismo per l'ovidutto e diverso da quello isolato dall'apparato respiratorio delle galline.

BIBLIOGRAFIA

1. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.*38(1):77-85.
2. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.* 2010 Jun;54(2):961-4.
3. Catania S, Ramirez AS, Gobbo F, Battanoli G, Dare CM, Bradbury JM. (2010). IOM 18th Congress of The International Organization For Mycoplasmology. July 11-16, Chianciano Terme, Siena, Italy *Mycoplasma synoviae* infection in multi-age layer hens, differentiation of two strains in tracheal and oviduct specimens.
4. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Battanoli G, Iob L, Nicholas R.A.J. (2010). XIIIth European Poultry Conference, Tours France, 23-27 August 2010. "Mycoplasma synoviae Infection in Multiage Layer Hens." Abstract and Full Paper, Pag. 253.
5. Catania S, Ramirez AS, Gobbo F, Brustolin M, Dare CM, Bradbury JM. (2010). Differenziazione di due ceppi di *Mycoplasma synoviae* da campioni di trachea e ovidutto provenienti da un allevamento di galline ovaiole. 49° Convegno Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA) Forlì, 29-30 aprile 2010. Pag. 115-116

ISOLAMENTO DI UN CEPPLO “ESOTICO” DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*, IN UN FENICOTTERO MINORE (*PHOENICONAIAS MINOR*) DI IMPORTAZIONE. CONSIDERAZIONE SU POSSIBILI VIE DI INTRODUZIONE DEI PATOGENI.

Catania S., Battanolli G., Brustolin M., Mazzacan E., Qualtieri K., Gobbo F., Iob L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale Dell’Università 10, 35020, Legnaro (PD), Italy; scatania@izsvenezie.it

Summary

Mycoplasma synoviae (MS) is an important cause of economic loss in the poultry industry. Respiratory and articular diseases are usually associated to MS infection causing high condemnation rates. Different *Mycoplasma* species have been isolated in wild birds although most of them are not considered specific pathogens of poultry. Moreover, there is lack of epidemiological findings on the possible role of wild birds in the transmission of pathogenic mycoplasma to the poultry industry. In this report we described the isolation of *Mycoplasma synoviae* from a captive lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). Tracheal swabs were submitted for *Mycoplasma* isolation in Experience medium and once samples were considered positive, a specific *vlhA* PCR was performed in order to point out any genetic difference between the flamingo MS and those stored in NCBI database. MS was isolated in the only bird showing signs of catarrhal tracheitis and fibrinous aerosacculitis. Sequencing of the product of *vlhA* PCR demonstrated a high identity with MS strains isolated in Australia, and therefore this strain should be considered exotic to the EU. This clinical case is an example of the introduction of an exotic microorganism through the international animal trade.

INTRODUZIONE

I micoplasmi sono organismi unicellulari privi di parete. Possono infettare numerose specie viventi comprese i vegetali, gli animali e l’uomo. Nel settore avicolo, alcune specie come il *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ed il *Mycoplasma synoviae* (MS) sono considerate di particolare interesse in quanto provocano patologie sia nel pollo che nel tacchino che possono ripercuotersi sui parametri produttivi quali incremento della mortalità, scarse *performance* produttive ed un incremento degli scarti al macello. I micoplasmi possono trasmettersi sia per via verticale che per via orizzontale, per tali motivi i principali metodi di prevenzione si basano sulla costituzione di gruppi di riproduttori *free* e sulla scrupolosa applicazione di misure di biosicurezza. Purtroppo ad oggi l’epidemiologia delle micoplasmosi non è ancora del tutto chiara, complice anche la difficoltà di isolamento e di distinzione tra i vari ceppi. Questo comporta una difficoltà nello studio della diffusione della patologia non permettendo di correlare due o più eventi patologici. Per tale motivo in alcuni episodi vengono presi in considerazione, quale fonte di infezione, gli allevamenti rurali o gli uccelli selvatici. Proprio in questi ultimi volatili sono diverse le segnalazioni di isolamento di micoplasmi di interesse avicolo (3).

Recentemente, alcuni Autori hanno dimostrato la possibile differenziazione dei ceppi di *Mycoplasma synoviae* attraverso lo studio di un frammento del gene *vlhA* che

codifica per la *Most Surface Protein* (MSP), una proteina di membrana con attività antigenica (1, 2).

Con questo report segnaliamo l'isolamento di un ceppo di *Mycoplasma synoviae* in un fenicottero minore di recente importazione che dallo studio del gene *vlhA* non manifesta correlazioni con altri ceppi di MS isolati nel territorio italiano.

MATERIALI E METODI

Quattro carcasse di fenicottero minore (*Phoeniconaias minor*) sono state conferite presso la nostra sezione diagnostica a seguito di una mortalità piuttosto importante (10 decessi), manifestatasi in un gruppo di 12 animali recentemente acquistati da un parco zoologico italiano. Dalle carcasse conferite sono stati effettuati differenti approfondimenti diagnostici, quali l'esame anatomico-patologico, esami batteriologici, virologici, parassitologici ed istologici. Inoltre, da tutti gli animali sono stati effettuati tamponi tracheali per ricerca micoplasmi mediante metodica culturale. Il terreno utilizzato è stato il *Mycoplasma Experience*, la procedura ha previsto l'incubazione dei brodi inoculati in atmosfera al 5% di CO₂ per almeno 15 giorni. Detta procedura prevede la valutazione giornaliera delle brodo-colture per evidenziare eventuali acidificazioni o intorbidamenti degli stessi, in caso di acidificazione delle brodo-colture si è proceduto alla successiva semina in agar per l'isolamento. In caso di assenza di acidificazione allo scadere del 15° giorno di incubazione il brodo è stato inoculato in agar ed incubato alle medesime condizioni per ulteriori 15 giorni. I piastrini inoculati sono stati valutati giornalmente al fine di evidenziare le classiche colonie, in caso di assenza di crescita il campione è stato considerato negativo mentre in caso di presenza di colonie ascrivibili al genere *Mycoplasma* è stato considerato positivo. Tutti i brodi considerati positivi sono stati sottoposti a metodica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) per l'identificazione della o delle specie di micoplasma coinvolte.

Nello specifico caso i ceppi di micoplasmi isolati una volta identificati come *Mycoplasma synoviae* sono stati analizzati anche mediante PCR per il gene *vlhA*, secondo il protocollo pubblicato da Hammond e coll. (1), ed in seguito l'amplificato ottenuto è stato sequenziato al fine di evidenziare eventuali differenze.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'anamnesi gli animali presentavano debolezza, letargia, scarse attività motorie e morivano in un grande stato di inanizione. All'esame autoptico si è rilevato in tutti i soggetti uno scadente stato di nutrizione, assenza di alimento nel tratto gastroenterico, presenza di materiale rossastro a livello intestinale, lesioni podali più o meno suppurate. In un solo soggetto, denominato numero 2, è stata rilevata una lieve tracheite di tipo catarrale ed aerosacculite fibrinosa localizzata solamente nel sacco aereo clavicolare. Gli esami batteriologici generici hanno dimostrato la presenza di stafilococchi coagulasi positivi dalle lesioni podali, ed *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* da campioni intestinali. Inoltre dal sacco aereo presentante lesioni sono stati isolati oltre lo stafilococco coagulasi positivo anche *Candida spp.* e *Rhodotorula spp.*. L'esame istologico del sacco aereo ha evidenziato la presenza di focolai infiammatori cronici con presenza di necrosi e cellule giganti multinucleate. La ricerca micoplasmi è risultata essere negativa in tre soggetti, mentre nel soggetto 2 già dopo 24 ore di incubazione è stata evidenziata acidificazione della brodo-cultura.

Dalla successiva semina in agar sono state evidenziate colonie tipiche dopo 24 ore di incubazione. L'identificazione della specie di micoplasma isolata è stata effettuata mediante metodica DGGE ed ha dimostrato la presenza di *Mycoplasma synoviae*.

Il ceppo isolato è stato inoltre sottoposto ad analisi del gene *vlhA*, dimostrando una notevole differenza dai ceppi comunemente isolati nel territorio italiano presenti nella nostra collezione. Inoltre, tale sequenza è stata comparata con le quelle depositate presso il database NCBI, manifestando una maggiore percentuale di similarità (99%) con alcuni ceppi isolati in Australia. Tale comparazione ha inoltre evidenziato alcune differenze con i ceppi di provenienza italiana ed europea presenti nel database.

Sulla base dei dati attualmente disponibili tali analisi permettono di affermare che il ceppo di *Mycoplasma synoviae* isolato nel fenicottero in questione potrebbe essere considerato estraneo al territorio italiano.

Tale segnalazione, a nostro parere, sottolinea quanto già conosciuto per altri patogeni e riveste particolare importanza anche alla luce del numero e della varietà di scambi che coinvolgono specie aviarie esotiche e che inconsapevolmente possono veicolare patogeni estranei ai nostri territori.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Hong Y, García M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zavala G, Kleven SH. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis.* 2004 Sep;48(3):606-16.
3. Ley D. H., Berkhoff J. E. and McLaren J. M. *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. *Avian Dis.* 40(2):480-483. 1996.

DIAGNOSTICA CLINICA E MOLECOLARE DELLE INFEZIONI DA *CIRCOVIRUS* NEI VOLATILI D'AFFEZIONE

Circella E.¹, Pugliese N.¹, Todisco G.², Camarda A.¹

¹*Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bari "Aldo Moro", Italia*

²*Dipartimento di Scienze Biomediche comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Teramo, Italia*

Summary

In this study, we report our clinical and laboratory experiences about circovirus infection in pet birds. In the most cases, typical changes in feathers have not been observed. Lesions of the beak were never present. The affected birds were often weak and depressed without specific symptoms and were more susceptible to bacterial and parasitic secondary infection probably due to immunodeficiency. In the diagnosis, feathers resulted useful and efficient samples even in the several cases with the lack of feather changes.

INTRODUZIONE

Circovirus è l'agente eziologico della Malattia del Becco e delle Penne (Beak and Feather Disease), patologia immunodepressiva (Todd, 2004) caratterizzata dalla comparsa di anomalie del piumaggio e del becco. L'infezione è stata evidenziata in più di 60 specie appartenenti all'Ordine Psittaciformes (Ortiz-Cathedral et al. 2010) ed è stata segnalata in diverse parti del mondo. Inizialmente segnalata in Australia (Pass and Perry, 1984), è stata successivamente riscontrata in USA (Dahlhausen et Radabaugh, 1997), Nuova Zelanda (Ha et al. 2007; Ha et al. 2009), Africa (Heath et al. 2004; Varsani et al. 2010), Giappone (Katoh et al. 2010). Attualmente, si ritiene che l'infezione sia presente in tutti i continenti. In Europa, studi epidemiologici indicano in Germania un'incidenza del 39,2% (Rahaus and Wolff, 2003) mentre in Italia pari all'8%. (Bert et al. 2005). Probabilmente, tali dati potrebbero rappresentare sottostime visto che l'infezione non sempre si manifesta con sintomi specifici e pertanto potrebbe sfuggire anche durante eventuali *iter* diagnostici. In questo lavoro vengono discussi, alla luce delle esperienze cliniche, i risultati delle ricerche di laboratorio condotte su volatili sintomatici presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari.

MATERIALI E METODI

Casi clinici

Nel corso dell'attività clinica svolta su volatili d'affezione presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, n. 28 volatili sono stati sottoposti a test diagnostici per BFDV (BFD Virus) per sospetta infezione (tabella 1). I soggetti di età compresa tra pochi mesi e 2 anni di vita (solo un soggetto aveva 5 anni), appartenevano a proprietari diversi, erano stati allevati in abitazioni diverse e non avevano avuto contatti tra loro. Tra questi, 20 volatili erano giunti presso il Dipartimento per esser sottoposti a visita clinica, mentre 8 erano soggetti deceduti inviati per indagini autoptiche. Negli esemplari esaminati, l'infezione da *Circovirus* veniva considerata o per la comparsa di anomalie

del piumaggio compatibili con l'infezione o per sospetta immunodepressione in quanto, pur in assenza di lesioni al piumaggio, presentavano un'anamnesi di patologie o stati di malessere ricorrenti (tabella 2). In nessun caso venivano osservate anomalie a carico del becco.

Tra i soggetti sottoposti ad autopsie, i 5 cenerini appartenevano a distinti proprietari, avevano un'età inferiore a 6 mesi di vita e presentavano tutti la stessa anamnesi: acquistati a qualche mese di vita in fase di svezzamento, erano stati allevati *allo stecco*, ciascuno dal suo nuovo proprietario, e dopo un periodo di malessere erano deceduti.

I canarini, di età compresa tra 1 e 1,5 anni, provenivano invece da un allevamento in cui era stata osservata la comparsa di mortalità senza la presenza di una sintomatologia ben precisa, ma solo dopo osservazione di sintomi aspecifici e pertanto comuni a numerose patologie (arruffamento delle penne, sonnolenza, minore assunzione di mangime, feci di consistenza ridotta).

Indagini di laboratorio - Ricerca di circovirus mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'estrazione di DNA virale è stata effettuata, nei soggetti sottoposti a visita clinica, a partire dalle penne prelevate direttamente dall'animale al momento della visita. In alcuni casi, contemporaneamente alle penne sono stati raccolti e analizzati campioni di feci. Dai soggetti sottoposti a necropsia, sono stati prelevati campioni di milza, fegato, contenuto intestinale. Per le reazioni di PCR sono state utilizzate due diverse coppie di *primers* secondo protocolli descritti in bibliografia (Ypelaar et al. 1999; Todd et al. 2001) in maniera da amplificare una porzione più ampia del genoma virale per ulteriori approfondimenti di ricerca, tuttora in corso, basati sull'analisi di sequenza degli amplificati ottenuti.

RISULTATI

Tra gli esemplari sottoposti a visita clinica ed analizzati per BFDV è stata evidenziata la presenza del virus in 11 volatili su 20 (55 %) (tabella n. 2).

Tuttavia, tra i soggetti analizzati per anomalie del piumaggio compatibili con la malattia del becco e delle penne soltanto un soggetto è risultato positivo. Al contrario, nei pappagalli privi di lesioni alle penne ma con sospetta immunodepressione per il manifestarsi nel tempo di problemi e patologie ricorrenti di varia eziologia, il virus veniva riscontrato in ben 10 soggetti su 13 analizzati.

Tutti i campioni d'organo prelevati dai cenerini sottoposti a necropsia sono risultati fortemente positivi. In tali soggetti venivano inoltre evidenziate lesioni legate a contemporanee patologie frequentemente condizionate da stati immunodepressivi: in un caso, infatti, erano presenti gravi lesioni da *Aspergillus fumigatus* a livello dei sacchi aerei; in un altro esemplare veniva riscontrata una grave enterite, a tratti emorragica, indotta da una massiva infestazione di coccidi; in un altro veniva diagnosticata, mediante biologia molecolare, una concomitante infezione da *polyomavirus*; in un altro ancora venivano evidenziate lesioni extraintestinali multiple indotte da *Escherichia coli*.

La PCR eseguita sui campioni prelevati dai canarini deceduti ha confermato la presenza del virus.

DISCUSSIONE

Tra i pappagalli analizzati per anomalie del piumaggio compatibili con la malattia del becco e delle penne soltanto un soggetto è risultato positivo. Tale dato evidenzia

l'importanza di un'attenta diagnosi differenziale tra la malattia del becco e delle penne ed altre patologie, di natura infettiva e non, che possono creare disordini del piumaggio simili o sovrapponibili, quali squilibri nutrizionali, disordini epatici o patologie comportamentali con autotraumatismo del piumaggio. In molti dei casi clinici con assenza di infezione da BFDV, infatti, la correzione di alcuni tra questi fattori ha comportato successivamente la risoluzione dei problemi di piumaggio osservati.

Al contrario, nei pappagalli privi di lesioni alle penne ma che avevano manifestato nel tempo problemi clinici e patologie ricorrenti, il virus veniva riscontrato nel 76.9% dei casi analizzati, evidenziando che BFDV era alla base dello stato di immunodepressione che comprometteva lo stato di salute degli animali esponendoli a stati patologici frequenti. Pertanto l'infezione, più spesso di quanto ritenuto, si manifesta in maniera subdola senza la comparsa di manifestazioni esteriori che inducano a sospettarla.

La tipologia di campione da utilizzare per una corretta diagnosi è di estrema importanza. Dalle esperienze cliniche e di laboratorio riportate, la penna risulterebbe un campione idoneo ed estremamente utile ai fini diagnostici, permettendo facilmente la diagnosi *in vivo* senza la necessità di ricorrere a prelievi ematici sicuramente più stressanti per il volatile. Inoltre l'analisi delle penne è risultata attendibile ed idonea anche nei diversi casi in cui mancavano anomalie del piumaggio, confermando che la localizzazione del virus a livello dei follicoli delle penne è massiva anche in assenza di alterazioni esteriori.

In 4 soggetti sottoposti a visita clinica e risultati positivi a BFDV a livello delle penne, in cui contemporaneamente a queste sono state testate anche le feci, queste ultime sono risultate positive solo in due casi. Nonostante il virus si localizzi e replichi anche a livello intestinale, la sua eliminazione attraverso le feci è probabilmente incostante e meno cospicua, rendendo questo campione meno attendibile a fini diagnostici. Le feci, inoltre, rappresentano una tipologia di campione che più facilmente, rispetto alla penna, consente la formazione di aspecifici che rendono meno agevole la diagnosi mediante PCR.

La positività al virus dei campioni d'organo prelevati dai cenerini deceduti sottoposti a necropsia era alla base dello stato di immunodepressione sofferto dai soggetti, giustificando la presenza di quadri anatomopatologici, confermati dalle specifiche indagini di laboratorio, tipici di patologie frequentemente condizionate da stati immunodepressivi (infestazioni da coccidi, infezioni da *polyomavirus* e da *Escherichia coli*), non sempre frequentemente evidenziabili in soggetti così giovani (infestazioni da *Aspergillus fumigatus*).

La diversa età dei pappagalli deceduti (pochi mesi di vita) rispetto all'età media dei soggetti giunti presso il Dipartimento per la visita clinica (qualche anno) confermerebbe la gravità delle infezioni da *circovirus* in volatili molto giovani. In tali soggetti, infatti, organi quali la Borsa di Fabrizio e il timo, di fondamentale importanza per la risposta immunitaria, sono in pieno sviluppo mentre vanno incontro ad atrofia e regressione con la crescita dell'animale. Pertanto nelle infezioni precoci il virus, che ha uno spiccato tropismo per i tessuti linfoidei, trova la possibilità di replicare massivamente compromettendo in maniera più pesante la risposta immunitaria dell'organismo ed inducendo stati patologici con un più elevato tasso di mortalità. Nelle infezioni più tardive il soggetto colpito, sia pur compromesso ed esposto ad infezioni di diversa natura rispetto a soggetti sani, spesso riesce a sopravvivere per un periodo di tempo anche molto più lungo.

I risultati ed il numero di canarini analizzati non sono sufficienti a poter attribuire la mortalità registrata nell'allevamento di canarini a *circovirus*. Per quanto più rara, l'infezione da *circovirus* è stata, negli ultimi anni, riscontrata in questa specie (Todd et al.

2001; Rampin et al. 2006). Tuttavia, l'evoluzione clinica e le ripercussioni patologiche non sono ancora ben note e definite in questa specie.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano la presenza e la circolazione di circovirus, nel nostro territorio, non solo tra pappagalli ma anche tra altri volatili d'affezione. La capacità dei soggetti infetti di eliminare il virus massivamente attraverso la desquamazione cutanea e l'elevata resistenza del virus nell'ambiente rendono questa infezione, dalle così gravi ripercussioni, di facile diffusione. La mancata disponibilità di un vaccino commerciale ne aggrava le difficoltà di controllo. Attualmente, la prevenzione è basata principalmente sulle norme di profilassi igienico-sanitaria e sul controllo e la quarantena dei soggetti di nuova introduzione. Non essendo ancora, ad oggi, disponibili dati relativi ai virus circolanti sul territorio italiano, approfondimenti di ricerca basati sulla caratterizzazione genetica dei virus riscontrati potranno fornire informazioni utili per chiarire meglio l'epidemiologia di questa temibile infezione e migliorarne il controllo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ha HJ., Anderson IL., Alley MR., Springett BP., Gartrell BD. (2007). The prevalence of beak and feather disease virus infection in wild populations of parrots and cockatoos in New Zealand. *N Z Vet J*. Dec; 55(6): 361.
2. Ha HJ., Alley MR., Cahill JI., Howe L., Gartrell BD. (2009). The prevalence of psittacine beak and feather disease virus infection in native parrots in New Zealand. *N Z Vet J*. Feb; 57(1): 50-2.
3. Bert E., Tomassone L., Peccati C., Navarrete MG., Sola S.C. 2005. Detection of Beak and Feather Disease Virus (BFDV) and Avian Polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J Vet Med B* 52, 64-68.
4. Katoh H., Ohya K., Ise K., Fukushi H. 2010. Genetic analysis of beak and feather disease virus derived from a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) in Japan. *J Vet Med Sci*. 72(5): 631-634.
5. Heath L., Martin DP., Warburton L., Perrin M., Horsfield W., Kingsley C., Rybicki E.P., Williamson A.L. 2004. Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in Southern Africa. *J Virol* 78, 9277-9284.
6. Pass D.A., Perry R.A. 1984. The pathology of beak and feather disease. *Aust Vet J*, 61, 69-74.
7. Ortiz-Catedral L., Kurenbach B., Massaro M., McInnes K., Brunton D.H., Hauber M.E., Martin D.P., Varsani A. 2010. A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*) in New Zealand *Arch Virol* 155: 613-620
8. Dahlhausen M.S., Radabaugh M.S. 1997. Update on Psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus. *Proc. MASA AV Conference* 51-57.
9. Varsani A., de Villiers G.K., Regnard G.L., Bragg R.R., Kondiah K., Hitzeroth I.I., Rybicki E.O. 2010. A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Arch Virol* 155: 435-439.
10. Ypelaar I., Bassami M.R., Wilcox G.E., Raidal S.R. 1999. A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet Microb* 68, 141-148.

11. Rampin T., Manarolla G., Pisoni G., Recordati C., Sironi G. 2006. Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. *Avian Pathology*, 35(4), 277-279
12. Todd D., Weston J., Ball N.W., Borghmans B.J., Smyth J.A, Gelmini L., Lavazza A. 2001. Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathology* 30, 321-325.
13. Todd D. 2004. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMVVS. *Vet Microbiol*, Feb 4; 98(2):169-174.

Tabella 1. Volatili esaminati per sospetta infezione da *circovirus*.

	Specie	Esemplari analizzati
VISITE CLINICHE	Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)	1
	Pappagallino ondulato (<i>Melopsiccatu s ondulatu s</i>)	1
	Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	3
	Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	2
	Amazzone Fronte Azzurra (<i>Amazona aestiva</i>)	2
	Parrocchetto monaco (<i>Myiopsitta monachus</i>)	2
	Ara spalle rosse (<i>Ara nobilis</i>)	1
	Ara ali verdi (<i>Ara Chloroptera</i>)	1
	Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)	2
	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	3
	Ecletto (<i>Eclectus roratus</i>)	1
	Pionus	1
AUTOPSIE	Pappagalli Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	5
	Altri volatili Canarino (<i>Serinus canaria</i>)	3
Totale		28

Tabella 2. Riscontro di *circovirus* in soggetti con sintomatologia differente.

		Motivo alla base della visita clinica	
		Anomalie del piumaggio	Sospetta immuno- depressione
Specie		N° positivi (N° analizzati)	N° positivi (N° analizzati)
Pappagalli	Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)	-	1 (1)
	Pappagallino ondulato (<i>Melopsiccatu s ondulatu s</i>)	-	1 (1)
	Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	-	3 (3)
	Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	-	1 (2)
	Amazzone Fronte Azzurra (<i>Amazona aestiva</i>)	1 (2)	-
	Parrocchetto monaco (<i>Myiopsitta monachus</i>)	0 (2)	-
	Ara spalle rosse (<i>Ara nobilis</i>)	-	0 (1)
	Ara ali verdi (<i>Ara Chloroptera</i>)	0 (1)	-
	Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)	-	1 (2)
	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	-	3 (3)
	Ecelto (<i>Eclectu s roratu s</i>)	0 (1)	-
	Pappagallo corona bianca (<i>Pionu s senili s</i>)	0 (1)	-
Totale		1 (7)	10 (13)

GENI DI VIRULENZA IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE IN CORSO DI COLIBACILLOSI

Circella E.¹, Pennelli D.², Tagliabue S.², Di Paola G.¹, Camarda A.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Italia

²Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Brescia, Italia

Summary

Escherichia (E.) coli infections cause important systemic and localized infections in poultry. In this study, *E. coli* isolated from lesions (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC) of layer hens affected by colibacillosis and from intestinal content of clinically healthy birds (Avian Faecal *Escherichia coli* - AFEC) were serotyped and investigated for the presence of virulence genes to find which were more closely related to the APEC isolates. Although a number of different serogroups observed, O78 was the predominant one among the isolates from colibacillosis. Statistically, the presence of the virulence genes, except for *astA*, was generally more associated with APEC strains. For the presence of specific virulence genes, *E. coli* isolated from lesions were not linked to a specific pathotype. Nevertheless statistically, some genes such as *cva/cvi*, *tsh*, *iss* and *iucD* were more strongly related to the colibacillosis isolates. In our opinion, the detection of these genes in a rapid test could provide useful information about the potential virulence of *E. coli* isolated in commercial layer hen flocks.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Escherichia (E.) coli* nel pollame sono causa di patologie sistemiche e localizzate (Barnes *et al.*, 2008). L'impatto economico di tali patologie nell'industria avicola, legato alla mortalità ed ai cali produttivi ha orientato la ricerca verso l'analisi degli stipiti di *E. coli* coinvolti.

Alcuni sierogruppi come O78, O1, O2 sono più frequentemente associati alla colibacillosi nel pollame (Barnes *et al.*, 2008), sebbene negli anni sia stato riportato il coinvolgimento anche di numerosi altri (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Circella *et al.*, 2009). Per quanto riguarda i fattori di virulenza che possono rendere uno stipite potenzialmente più patogeno, recentemente numerose ricerche sono state mirate ad identificare i geni che, se espressi, possono aumentare la patogenicità del germe e che possano fungere da markers di virulenza (Ngeleka *et al.* 2002; Johnson *et al.* 2006; Johnson *et al.*, 2008).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare, in *E. coli* isolati da galline ovaiole affette da colibacillosi ed ovaiole clinicamente sane, la distribuzione di otto diversi geni di potenziale virulenza (Ewers *et al.* 2005), al fine di individuare i più significativi come markers, in relazione alla loro reale incidenza in stipiti patogeni. È stato inoltre valutato il sierogruppo di appartenenza degli isolati al fine di identificare quelli più frequentemente associati a malattia nel nostro territorio e la distribuzione, in questi, dei geni di virulenza risultati più significativi.

MATERIALI E METODI

221 stipiti di *E. coli* isolati da galline ovaiole sono stati sierotipizzati e sottoposti a ricerca di geni di virulenza. Di questi, 130 (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC) provenivano da organi con lesioni (fegato, sacchi aerei, ovidutto) di soggetti affetti da colibacillosi mentre 91 (Avian Faecal *Escherichia coli* - AFEC) sono stati ottenuti da soggetti clinicamente sani mediante tampone cloacale. L'isolamento è avvenuto secondo le metodiche tradizionali e l'identificazione del germe in micrometodo mediante gallerie API20E (*Bio Mérieux, Marcy l'Étoile, Lyon, France*).

Caratterizzazione genetica. *astA* (enteroaggregative toxin), *iss* (increased serum survival protein), *irp2* (iron-repressible protein), *iucD* (aerobactin), *papC* (P-fimbriae), *tsh* (temperature-sensitive hemagglutinin), *vat* (vacuolating autotransporter toxin), *cva/cvi* (colicin V plasmid operon genes) sono stati ricercati mediante Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) (Ewers *et al.* 2005).

Analisi statistiche. I dati relativi alla distribuzione dei geni di virulenza nei diversi stipiti di *E. coli* sono stati valutati mediante analisi di **Pearson** al fine di stabilire le più significative correlazioni tra il riscontro dei geni di virulenza e la provenienza di *E. coli* da colibacillosi.

Sierotipizzazione. La sierotipizzazione è stata effettuata utilizzando antisieri monospecifici verso 40 differenti antigeni somatici O (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O68, O73, O75, O78, O83, O85, O86, O88, O92, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157) in piastre con pozzetti con fondo ad U in camera umida (Blanco *et al.*, 1998).

RISULTATI

Il riscontro dei geni virulenza ricercati è stato più frequentemente associato agli stipiti provenienti da lesioni (Tabella 1). Le analisi statistiche hanno confermato tali risultati evidenziando una correlazione particolarmente elevata con gli stipiti APEC per *tsh*, *iucD* e *cva/cvi* (Tabella 2). *astA1*, unico gene identificato in percentuali più elevate tra gli stipiti AFEC, ha mostrato una correlazione statistica negativa con *E. coli* provenienti da lesioni.

Rispettivamente 23 e 22 differenti sierogruppi sono stati identificati tra *E. coli* provenienti da lesioni e stipiti di origine intestinale (Tabella 3). O78 è risultato il sierogruppo più frequentemente identificato tra APEC.

Il 40% di stipiti APEC ed il 48.4% di stipiti AFEC non sono risultati tipizzabili sierologicamente.

I geni di virulenza non hanno mostrato sostanziali differenze di distribuzione nei diversi sierogruppi, ad eccezione di *cva/cvi* in *E. coli* O78 e *vat* in O2.

L'associazione di più geni di virulenza in uno stesso ceppo è stata osservata in particolare tra stipiti APEC e soprattutto in O78 e O2. Uno stipite O78 di origine intestinale è risultato totalmente privo dei geni di virulenza ricercati.

DISCUSSIONE

La presenza di geni di potenziale virulenza e la loro associazione in uno stesso ceppo è stata osservata soprattutto in *E. coli* provenienti da lesioni ed in particolare in *E. coli* O78 and O2. Tali geni, spesso associati a stipiti patogeni (Rodriguez-

Siek *et al.*, 2005; Vandekerchove *et al.*, 2005) possono incrementare, se espressi, il potenziale di virulenza del germe.

cva/cvi ha mostrato in questo studio la più elevata correlazione statistica con gli stipiti provenienti da malattia, portando a ritenere che possa avere un ruolo rilevante come *marker* di virulenza.

Tale gene è indicativo della presenza del plasmide ColV (Ewers *et al.*, 2005) che funge da vettore di diversi fattori di virulenza come ad esempio *tsh*, *iss*, geni codificanti per sistemi di acquisizione del ferro (Johnson *et al.*, 2006), o fattori di antibioticoresistenza (Wooley *et al.*, 1996).

Al contrario, *vat* associato in questa ricerca quasi esclusivamente a *E. coli* isolati da lesioni, è stato riscontrato spesso in O2. Per tale gene è stata osservata infatti una elevata associazione con specifici gruppi filogenetici di *E. coli* come il B2 (Restrieri *et al.* 2007), cui O2 frequentemente appartiene. Considerato che la maggioranza di stipiti associati a colibacillosi nel pollame generalmente appartiene ai gruppi A, B1 and D (Clemort *et al.* 2000; Rodriguez-Siek *et al.* 2005), l'importanza di questo gene come *marker* di virulenza potrebbe risultare limitata.

astA1, prevalentemente evidenziato in stipiti di origine intestinale, ha mostrato una correlazione negativa con *E. coli* provenienti da lesioni e con la presenza di altri geni quali *tsh* e *cva/cvi*, portando a ritenere che possa esserci una relazione tra *astA1* ed una ridotta tendenza del germe a diffondere in sede extraintestinale.

Sierogruppi come O78, O2, O1 e O8 decisamente prevalenti o esclusivi in ceppi provenienti da lesioni hanno confermato la loro associazione a stipiti provenienti da malattia (Barnes *et al.*, 2008; Ozawa *et al.* 2008) e la loro potenziale virulenza. Tuttavia, un significativo numero di *E. coli* con presenza multipla di geni di virulenza è risultata non tipizzabile sierologicamente o appartenente a sierogruppi, come O128, meno comunemente associati a malattia nel pollame. Inoltre, uno stipite O78 totalmente privo dei geni di virulenza ricercati è stato isolato tra *E. coli* provenienti da animali sani, confermando l'importanza di associare, alla sierotipizzazione, tecniche di caratterizzazione che forniscano ulteriori informazioni circa il potenziale patogeno del germe.

CONCLUSIONI

Nell'attività clinica di campo, ottenere informazioni circa il potenziale patogeno degli stipiti di *E. coli* circolanti in allevamento può essere di fondamentale importanza per poter eventualmente intervenire prontamente con interventi migliorativi nel management aziendale o protocolli terapeutici, riducendo il rischio di episodi di colibacillosi ricorrenti.

Pertanto, attualmente la ricerca in questo campo è orientata verso l'individuazione di geni che possano fungere da *markers* di virulenza. In questo studio, *E. coli* isolati da ovaiole affette da colibacillosi non sono stati associati a determinati patotipi o a specifici geni di virulenza. Tuttavia, tra i geni ricercati, sembrerebbe che *cva/cvi-tsh-iucD-irp2-iss* siano i più indicati per uno screening rapido di campo. Ulteriori approfondimenti saranno necessari per accertare il ruolo di *astA1* come *marker* negativo di diffusione intestinale.

BIBLIOGRAFIA

1. Barnes, J. H., Nolan, L. K., Vaillancourt JP. (2008). Colibacillosis. *Diseases of Poultry*, 12th ed. (pp. 691-737). Ames: Blackwell Publishing.
2. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Jansen, W.H., García, V., Vázquez, M.L., Blanco, J. (1998). Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Veterinary Microbiology*, 61: 229-235
3. Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4555-4558.
4. Circella E., Pennelli D., Tagliabue S., Ceruti R., Giovanardi D., Camarda A. (2009). Virulence-associated genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* of turkey. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 8; p. 775-779, ISSN: 1594-4077
5. Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H.C., Wieler, L.H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 49: 269-273
6. Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J., Nolan, L.K. (2006). DNA Sequence of a ColV Plasmid and prevalence of selected Plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, 188 (2), 745-758.
7. Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberg, S.C., Nolan, L.K. (2008). Identification of minimal predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12): 3987-3996.
8. Ngeleka, M., Brereton, L., Brown, G., Fairbrother, J.M. (2002). Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*- and *iuc*-DNA sequences and antibiotic sensitivity of isolates from internal and the cloacae of broilers. *Avian Diseases*, 46, 143-152.
9. Ozawa M., Kazuki H., Kojima A., Asai T., Sameshima T. (2008). Antimicrobial susceptibilities, serogroups and molecular characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Diseases*, 52: 392-397.
10. Restieri, C., Garriss, G., Locas, M., Dozois, C.M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(5): 1553-1562
11. Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K., (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*. 36: 241-256
12. Vandekerchove D., Vandemaele F., Adriaensen C., Zaleska M., Hernalsteens J.P., De Baets L., Butaye P., Van Immerseel F., Wattiau P., Laevens H., Mast J., Goddeeris B., Pasmans F. (2005). Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Veterinary Microbiology*, 108: 75-87

13. Wooley R.E., Gibbs P.S., Dickerson H.W., Brown J., Nolan, L. K. (1996). Analysis of plasmids cloned a from virulent avian *Escherichia coli* and transformed into *Escherichia coli* DH5 alpha. *Avian Diseases*, 40 (3), 533-539
14. Zanella, A., Alborali, G. L., Bardotti, M., Candotti, P., Guadagnini, P. F., Martino, P. A. Stonfer, M. (2000). Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian Pathology*. 29(4): 311-317

Tabella 1. Distribuzione di geni di virulenza in *E.coli* isolati da lesioni o di origine intestinale (n=221).

	<i>AstA1</i>	<i>Iss</i>	<i>Irp2</i>	<i>IucD</i>	<i>PapC</i>	<i>Tsh</i>	<i>Vat</i>	<i>Cva/cvi</i>
<i>APEC</i> (n° 130)	22 ^a (16.9) ^b	102 (78.5)	70 (53.9)	85 (65.4)	17 (13.1)	52 (40)	30 (23)	74 (56.9)
<i>AFEC</i> (n° 91)	25 (27.5)	43 (47.3)	20 (22)	27 (29.7)	6 (6.6)	7 (7.7)	5 (5.5)	8 (8.8)

Note: ^aNumero di isolati positivi, ^b% di positività

Tabella 2. Correlazioni statistiche tra presenza di geni di virulenza e origine (lesioni da colibacillosi) di *E. coli* (n=221).

	<i>Colibacillosis</i>									
	<i>lesions</i>									
	<i>astA1</i>	<i>iss</i>	<i>Irp2</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>			
<i>astA1</i>	Pearson Correlation									
	Sig. (2-tailed)									
	N									
<i>Iss</i>	Pearson Correlation									
	Sig. (2-tailed)									
	N									
<i>irp2</i>	Pearson Correlation	.348(**)								
	Sig. (2-tailed)	.000								
	N	221								
<i>iucD</i>	Pearson Correlation	.225(**)	.410(**)	.633(**)						
	Sig. (2-tailed)	.001	.000	.000						
	N	221	221	221						
<i>papC</i>	Pearson Correlation	.185(**)		.321(**)	.336(**)					
	Sig. (2-tailed)	.006		.000	.000					
	N	221		221	221					
<i>Tsh</i>	Pearson Correlation	.359(**)	.394(**)	.395(**)	.514(**)	.163(*)				
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.015				
	N	221	221	221	221	221				
<i>Vat</i>	Pearson Correlation	.237(**)	.262(**)	.473(**)	.378(**)	.420(**)	.214(**)			
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.000	.001			
	N	221	221	221	221	221	221			
<i>Cva/cvi</i>	Pearson Correlation	.490(**)	-.124	.583(**)	.627(**)	.168(*)	.659(**)	.411(**)		
	Sig. (2-tailed)	.000	.065	.000	.000	.013	.000	.000		
	N	221	221	221	221	221	221	221		

Note: **Significatività 0.01 (2-tailed);

* Significatività 0.05 (2-tailed).

Tabella 3. Sierogruppi riscontrati in *E.coli* isolati da lesioni e di origine intestinale (n=221).

	<i>APEC (n° 130)</i>		<i>AFEC (n° 91)</i>	
<i>Non tipizzabili</i>	52	(40)	44	(48.4)
<i>Tipizzabili</i>	78^a	(60)^b	47	(51.6)
O1	3	(2.3)	-	-
O2	7	(5.4)	2	(2.2)
O4	1	(0.8)	3	(3.3)
O6	1	(0.8)	1	(1.1)
O8	5	(3.8)	-	-
O10	1	(0.8)	1	(1.1)
O11	2	(1.5)	3	(3.3)
O15	-	-	3	(3.3)
O20	1	(0.8)	2	(2.2)
O21	-	-	2	(2.2)
O45	1	(0.8)	1	(1.1)
O73	1	(0.8)	2	(2.2)
O75	2	(1.5)	1	(1.1)
O78	25	(19.2)	2	(2.2)
O86	2	(1.5)	1	(1.1)
O88	3	(2.3)	4	(4.4)
O101	1	(0.8)	1	(1.1)
O103	2	(1.5)	3	(3.3)
O111	1	(0.8)	-	-
O128	6	(4.6)	1	(1.1)
O139	8	(6.2)	5	(5.5)
O141	1	(0.8)	3	(3.3)
O147	-	-	2	(2.2)
O149	2	(1.5)	-	-
O153	1	(0.8)	1	(1.1)
O157	1	(0.8)	3	(3.3)

Note: ^aNumero di isolati, ^b% di positività

ANALISI MOLECOLARE DI CEPPI DEL *CIRCOVIRUS* DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI IN ITALIA. RISULTATI PRELIMINARI

Conzo G.¹, Dotto G.², Cassano D.², De Guz D.³, Piccirillo A.²

¹*Veterinario libero professionista, Verona*

²*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020, Legnaro (Padova)*

³*Veterinario libero professionista, Trepuzzi (LE)*

Summary

Psittacine Beak and Feather Disease (PBFD) shows a broad host range within captive psittacine populations. Since clinical findings of PBFD in parrots often differ on the basis of the species and the age of infected psittacines, it has been speculated that a species-specificity of PBFDV strains may exist. The phylogenetic analysis of 9 PBFDV strains isolated in Italy from October 2010 to February 2011 showed some degree of genetic variability related to the infected species and clinical signs.

INTRODUZIONE

La Malattia del becco e delle penne degli psittacidi (PBFD) fu descritta per la prima volta negli anni '70 in Australia in diverse specie di *Cacatua* (Pass & Perry, 1984). In seguito la presenza di questa malattia è stata riportata in numerosi altri Paesi del mondo, compresa l'Italia (Conzo *et al.*, 1997, Bert *et al.*, 2005).

La PBFD è stata descritta in più di 40 specie di pappagalli e virtualmente tutte le specie di Psittaciformi sono ritenute sensibili all'infezione (Gerlach, 1994; Cross, 1996), sebbene quelle originarie del Sud America siano considerate più resistenti in quanto più raramente sviluppano la malattia (Kondiah *et al.*, 2005). Poiché la presentazione clinica della PBFD varia da specie a specie (Gerlach, 1994; Harrison, 2006), si è ipotizzato che vi possa essere una specie-specificità dei ceppi virali nei confronti delle diverse specie di pappagalli (Bassami *et al.*, 2001; Varsani *et al.*, 2011).

L'ultimo studio sulla diversità genetica del *Circovirus* della PBFD (Varsani *et al.*, 2011) ha proposto la classificazione dei ceppi virali in 14 *cluster*, identificati con lettere in ordine alfabetico dalla A alla N, cui si aggiungono 3 *cluster* nettamente separati dai precedenti ed isolati esclusivamente da Pappagallini ondulati (*Melopsittacus undulatus*), per i quali è stata proposta una riclassificazione tassonomica come nuova specie "*Budgerigar Circovirus*" (BCV). Mentre alcuni ceppi presentano una localizzazione geografica specifica, per altri si osserva una certa distribuzione apparentemente casuale, probabilmente correlata al commercio internazionale di uccelli ornamentali.

La nostra indagine, prima in Italia sull'analisi genetica di ceppi virali della PBFD, si è proposta di identificare, con metodi biomolecolari, la presenza di *Circovirus* della PBFD nelle diverse specie di psittacidi detenute in cattività nel territorio italiano e confrontare le sequenze nucleotidiche di porzioni del genoma di questi, tentando di mettere in risalto la possibile variabilità esistente tra i vari ceppi in rapporto alla distribuzione geografica, alla specie e alle manifestazioni cliniche.

MATERIALI E METODI

Campioni

In collaborazione con diversi veterinari liberi professionisti che operano nel territorio italiano, dall'ottobre 2010 al febbraio 2011 sono stati campionati 202 pappagalli, sia vivi (192 soggetti) che venuti a morte (10 soggetti), appartenenti a 38 specie diverse (Tabella 1), distribuiti in varie aree geografiche ed alloggiati presso allevamenti, attività commerciali e parchi faunistici o detenuti da privati come "pet". In totale sono stati prelevati 195 campioni di sangue intero e 24 campioni di tessuto (8 di fegato, 2 di milza, 4 di rene, 2 di intestino, 3 di polmone, 3 di cuore e 2 campioni di penne e relativi follicoli cutanei).

La maggior parte dei 192 soggetti in vita si presentava in buone condizioni generali di salute, ad eccezione di 16 pappagalli che presentavano alterazioni di vario grado del piumaggio. I 10 pappagalli venuti a morte presentavano differenti lesioni agli organi interni (Tabella 2).

I campioni ematici sono stati prelevati dalla vena giugulare o dalla vena brachiale e raccolti in provette sterili con anticoagulante EDTA.

Tutti i campioni venivano conservati tra +0°C e +5°C se essi erano processati lo stesso giorno della raccolta o il successivo, oppure conservati a -20°C se l'estrazione del DNA virale veniva eseguita a distanza di qualche giorno dal prelievo.

Estrazione del DNA virale

La procedura di estrazione del DNA virale dai campioni ematici e dai tessuti è stata eseguita utilizzando il kit commerciale "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics Corporation), mentre l'estrazione dai campioni di penne e follicoli annessi è stata eseguita utilizzando il kit commerciale "DNeasy Blood & Tissue Kit" (Qiagen), seguendo le istruzioni dei produttori.

Polymerase chain reaction

Tutti i campioni sono stati sottoposti a PCR per l'amplificazione del gene ORFV1 codificante per la proteina REP del *Circovirus* della Malattia del becco e delle penne degli psittacidi. La coppia di *primer* oligonucleotidici utilizzata in questo studio è quella suggerita da Ypelaar et al. (1999).

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore automatico 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystem), in un volume di reazione finale di 30 µl ed utilizzando l'*Amplitaq Gold with GeneAmp* (Roche Diagnostics Corporation). Ad ogni reazione di amplificazione si aggiungeva un controllo negativo e un controllo positivo, gentilmente fornito dal Dr. C. Terregino dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sezione di Padova. I prodotti della PCR venivano separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e le bande visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc™ XR* (Bio-rad). Ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva pUC *marker* 8 (Fermentas Life Sciences) come marcatore di peso molecolare.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

Prima di procedere con il sequenziamento nucleotidico, tutti i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit commerciale "High Pure PCR Cleanup Micro Kit" (Roche Diagnostics Corporation) seguendo le istruzioni fornite del produttore. I prodotti delle reazioni di amplificazione sono stati sequenziati in entrambe le direzioni

utilizzando gli stessi *primer* di PCR. E' stato utilizzato il kit *Applied Biosystems - Prism-Perkin Elmer*, Foster City, CA che si basa sulla chimica dell'*ABI PRISM Big-Dye terminator v3.1*.

L'analisi e l'assemblaggio dei cromatogrammi sono stati eseguiti utilizzando rispettivamente i software *FinchTV* versione 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) e *ChromasPro*, versione 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Australia). E' stata poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze consenso con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il server BLAST del database NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Le sequenze consenso così ottenute sono state allineate tra loro e con quelle disponibili in *Genbank* mediante *ClustalW* del *Pôle Bioinformatique Lyonnais*, France, disponibile on-line al sito http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html, con l'obiettivo di confrontarle e di calcolare le percentuali d'identità. Le sequenze sono state poi sottoposte ad analisi filogenetica utilizzando l'algoritmo *neighbour-joining* col software MEGA4. La robustezza dell'albero ottenuto è stata verificata mediante 1000 repliche di *bootstrap* e sono stati considerati significativi solo quelli >70, che corrispondono ad un intervallo di confidenza >95%.

RISULTATI

Su un totale di 202 animali testati, 9 sono risultati positivi (positività: 4,45%) per *Circovirus*; in 6 casi (positività: 3,12%) si trattava di campioni ematici provenienti da animali vivi, mentre in 3 dei 10 soggetti venuti a morte (positività 30%) è stato rinvenuto il virus da campioni di tessuto epatico (Tabella 3).

Per l'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche del gene ORFV1 dei ceppi di *Circovirus* identificati nella presente indagine, è stata utilizzata una sequenza di 643 bp a causa di alcune ambiguità presenti alle estremità 3' e 5' in prossimità dei *primer*, che ci ha indotti a ridurre la lunghezza di ciascuna sequenza di circa 60 bp. L'analisi eseguita con *ClustalW* ha permesso di rilevare un'identità di sequenza compresa tra il 92,5% e il 100% e una discreta variabilità intraspecifica tra i ceppi, con una percentuale di siti variabili intorno al 7,5% per un totale di 48 siti. I siti polimorfici erano frequenti soprattutto confrontando i ceppi E e LR di Ecletto (*Eclectus roratus*) e Cenerino (*Psittacus erithacus*) rispettivamente, con i restanti 7 ceppi. Infatti, l'analisi delle sequenze dei ceppi 32, 36 e 43 di Lorichetto arcobaleno (*Trichoglossus haematodus*) e il ceppo 37 di Lori testa nera (*Lorius lory*) ha evidenziato un'identità del 100%. Parimenti, il confronto tra i 4 ceppi appena citati e i ceppi 30 e 31 di Lorichetto arcobaleno (*Trichoglossus haematodus*) e 28 di Rosella comune (*Platycercus eximius*) ha mostrato una percentuale di identità superiore al 99%. Infatti, ciascuno di questi 3 ceppi differiva dagli altri, escludendo E ed LR, per una sola sostituzione nucleotidica.

L'analisi filogenetica è stata eseguita con l'obiettivo di stimare le distanze sia tra i ceppi di *Circovirus* identificati in questo studio, sia tra questi e altri ceppi analizzati nel resto del mondo. Per uniformità, l'analisi è stata eseguita confrontando una porzione del gene ORFV1 presente in tutte le sequenze selezionate pari a 547 bp. L'albero filogenetico (Figura 1) ha permesso di distinguere diversi gruppi filogenetici. La maggior parte dei ceppi analizzati in questo studio appartiene a un unico gruppo (*cluster C*) supportato da un elevato valore di *bootstrap* (99). In

questo gruppo si inseriscono anche 2 ceppi di *Amazona auropalliata* (DQ304744) ed *Eos reticolata* (DQ304739) isolati a Taiwan. I ceppi che si inseriscono nel *cluster C* sono: 28 (28-Platycercus-eximius-IT), 30 (30-Trichoglossus-haematodus-IT), 31 (31-Trichoglossus-haematodus-IT), 32 (32-Trichoglossus-haematodus-IT), 36 (36-Trichoglossus-haematodus-IT), 37 (37-Lorius-lory-IT) e 43 (43-Trichoglossus-haematodus-IT) e formano un sottogruppo supportato da un buon valore di *bootstrap* (87). I ceppi LR ed E, invece, differiscono notevolmente dagli altri ceppi. Infatti, il ceppo LR (LR-Psittacus-erithacus-IT) di un Cenerino (*Psittacus erithacus*) di Macerata si inserisce nel gruppo indicato come *cluster B*, insieme a due ceppi rispettivamente di un *Psephotus haematotonotus* (DQ304746) e di un *Forpus coelestis* (DQ304748) isolati a Taiwan. Parimenti, il ceppo E (E-Eclectus-roratus-IT) di un Ecletto (*Eclectus roratus*) di Perarolo (PD), fa parte di un terzo gruppo (*cluster A*), filogeneticamente distante dai *cluster B* e *C*, in cui sono inseriti gli altri ceppi oggetto di studio.

DISCUSSIONE

Nel presente studio sono state analizzate le sequenze nucleotidiche di 9 ceppi di *Circovirus* della Malattia del Becco e delle Penne degli Psittacidi (PBF) isolati da varie specie di pappagalli presenti nel territorio italiano. In particolare, l'analisi è stata eseguita su una porzione del gene ORFV1 che codifica la proteina REP (*Replication Associated Protein*) coinvolta nel ciclo replicativo virale.

L'analisi filogenetica ha evidenziato che la maggior parte dei ceppi esaminati nel presente studio (28-Platycercus-eximius-IT, 30-Trichoglossus-haematodus-IT, 31-Trichoglossus-haematodus-IT, 32-Trichoglossus-haematodus-IT, 36-Trichoglossus-haematodus-IT, 37-Lorius-lory-IT e 43-Trichoglossus-haematodus-IT) si inserisce in un *cluster* comune (*cluster C*) insieme a 2 ceppi (DQ304744 e DQ304739) originari di Taiwan. Questa elevata similarità non deve sorprendere poiché proprio questo Paese, antecedentemente al blocco delle importazioni di uccelli da Paesi extra-UE (Dicembre 2006), era tra i principali esportatori di Psittacidi verso l'Europa. E' verosimile, quindi, che questi ceppi del virus della PBF siano stati introdotti nel nostro Paese proprio con le importazioni di pappagalli da Taiwan. Cinque dei ceppi inseriti nel *cluster C* (30, 31, 32, 36 e 37) provenivano da pappagalli, di età compresa tra 1 e 2 anni ed in apparente buono stato di salute, ospitati in un *pet shop* della provincia di Verona. Un sesto ceppo (43) è stato isolato da un Lorichetto di 6 mesi d'età, proveniente dalla stessa zona geografica e venuto a morte in seguito ad una grave forma di epatite. Questi dati confermerebbero una certa variabilità nello sviluppare la malattia in funzione dell'età del soggetto infettato (Gerlach, 1994). Il settimo ceppo (28) ascrivibile al medesimo *cluster* è stato, invece, isolato dal fegato di una Rosella comune di 2 anni d'età della provincia di Bergamo, venuta a morte con buone probabilità proprio per una forma acuta di PBF, come testimoniano i segni di epatite necrotizzante rinvenuti alla necropsia. Tali reperti sono frequenti nella forma acuta di PBF che colpisce i soggetti giovani, ma decisamente rari in un soggetto adulto (Schoemaker et al., 2000; Harrison, 2006). Possiamo supporre, quindi, che ceppi che prediligono come ospiti particolari specie, in questo caso appartenenti alla famiglia dei Loridi, e in grado di determinare forme cliniche fatali nei soggetti giovani, possano infettare anche altre specie e dare in queste particolari forme cliniche, diverse da quella tipica.

Per quanto riguarda, invece, gli altri due ceppi virali (LR-Psittacus-erithacus-IT e E-Eclectus-roratus-IT), essi sono da ricondurre a eventi filogenetici indipendenti dagli altri ceppi, in quanto inseriti in *cluster* filogeneticamente lontani (*cluster* B e A, rispettivamente). Ciò è molto probabilmente da correlare alla diversa provenienza geografica. Il ceppo LR isolato da un Cenerino proveniente da un allevamento di Macerata si inserisce nel *cluster* B, insieme a due ceppi isolati rispettivamente da un *Psephotus haematonotus* (DQ304746) e da un *Forpus coelestis* (DQ304748) a Taiwan. Anche la vicinanza genetica di questo ceppo con i due taiwanesi potrebbe trovare la medesima spiegazione data in precedenza per i ceppi del *cluster* C. Nel nostro caso si trattava di un Cenerino di 5 mesi d'età, venuto a morte con la forma acuta di PBF, rapidamente fatale, descritta tipicamente in questa specie in soggetti di età compresa tra le 7 settimane ed i 9 mesi, caratterizzata da una diffusa necrosi epatica (Harrison, 2006). Il ceppo E isolato da un Ecletto della zona di Perarolo (PD), fa parte di un terzo gruppo filogenetico (*cluster* A) distante dai *cluster* B e C, in cui si sono inseriti gli altri ceppi oggetto dello studio. Il pappagallo, dell'età di 4 anni, presentava sintomi perfettamente compatibili con la PBF in forma cronica con le tipiche lesioni distrofiche del piumaggio, ampiamente descritte in letteratura (Gerlach, 1994; Harrison, 2006).

Ad eccezione di quest'ultimo soggetto, tutti i pappagalli che presentavano alterazioni del piumaggio sono risultati negativi alla ricerca del *Circovirus* della PBF. Questo dato potrebbe trovare spiegazione nell'assenza di viremia al momento del prelievo ematico o con fenomeni di deplumazione attribuibili a cause differenti dalla PBF.

CONCLUSIONE

I nostri risultati, seppur preliminari, sembrano avvalorare l'ipotesi di una specificità di ceppi virali verso particolari specie ospiti o una regionalità geografica. Il raggruppamento dei 5 ceppi isolati da Lorichetto arcobaleno (*Trichoglossus haematodus*) nel *cluster* C, assieme al ceppo isolato dal Lori testa nera (*Lorius lory*), della stessa famiglia tassonomica dei Lorichetti, può far sospettare che possa esistere una certa specie-specificità. Questa ipotesi sembra essere supportata dall'albero filogenetico costruito in questo studio. Infatti, nella parte terminale dello stesso si può osservare un grande *cluster* (valore di *bootstrap* 100), in cui sono raggruppati un cospicuo numero di ceppi isolati da diverse specie appartenenti alla famiglia *Loridae*, nonché provenienti anche dalla stessa area geografica (Nuova Zelanda ed Australia). All'estremità opposta dell'albero, invece, si può identificare un *cluster* in cui sono raggruppati ceppi isolati da Cacatuidi, sempre dall'areale australiano. Ancora, ceppi isolati dai Pappagallini ondulati si ritrovano vicini filogeneticamente, nonostante la provenienza sia varia, così come sono vicini ceppi isolati da Cenerini. Da queste specie, comunque, sono state isolate anche varianti virali che compaiono a diversi livelli dello stesso albero filogenetico.

Analogamente a quanto riportato da altri autori (Ritchie et al, 2003; de Kloet & de Kloet, 2004; Khalesi et al., 2005; Shearer et al., 2008; Versani et al. 2011) possiamo quindi concludere che i rapporti tra ceppi di *Circovirus* della Malattia del becco e delle penne e le specie di psittacidi ospiti sono molto complesse ed è probabile che esistano ceppi adattatisi a determinate specie in grado di svolgere un differente ruolo patogeno in altre specie.

In conclusione, rileviamo l'importanza di eseguire ulteriori studi ed analisi al fine

di stabilire con maggior sicurezza quali siano le dinamiche che legano la specie-specificità dei ceppi virali, l'area geografica di cui fanno parte i ceppi virali o le modalità di evoluzione di questi, nonché il rapporto esistente tra varianti antigeniche virali, manifestazione clinica della malattia e caratteristiche immunologiche delle specie ospiti.

RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento per il prezioso aiuto fornito va ai colleghi: Gianmaria Antonazzo, Tommaso Collarile e Massimo Mariani.

BIBLIOGRAFIA

1. Bassami, M. R., Ypelaar, I., Berryman, D., Wilcox, G. E. and Raidal, S. R. (2001). Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology*, 279:392-400.
2. Bert, E., Tomassone, L., Peccati, C., Navarrete, M. G. and Sola, S. C. (2005). Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J. Vet. Med. B*, 52:64-68.
3. Conzo, G. Lavazza, A., Sironi, G., Magnino, S., Fabbi, M., Mella, L.F., Fioretti, A., Papparella, V. (1997). Malattia del Becco e delle Penne degli Psittacidi (PBFD): descrizione di un caso in un *Cacatua (Cacatua galerita)* d'importazione. Atti 35° Convegno SIPA. La Selezione Veterinaria, Agosto/Settembre 1997 (8-9), pp. 711-719.
4. Cross, G. M. (1996). Avian viral disease. In: *Disease of cage and aviary birds*, 3rd Ed. (W. J. Roskopf and R. W. Woerpel, Eds). William and Wilkins, Baltimore, pp. 548-567.
5. de Kloet, E. and de Kloet, S. R. (2004). Analysis of beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. *Arch. Virol.*, 149:2393-2412.
6. Gerlach, H. (1994). Circoviridae - Psittacine beak and feather disease virus. In: B. W. Ritchie, G. T. Harrison, L. R. Harrison (Eds). *Avian Medicine: Principles and Practice*, Lake Worth, FL: Wingers Publishing Corporation, pp. 894-903.
7. Harrison, G. J. (2006). Implication of viruses in clinical disorders - DNA Viruses - Circovirus: Psittacine beak and feather disease virus (PBFDV). In: G. J. Harrison, T. L. Lightfoot (Eds). *Clinical Avian Medicine*, Spix Publishing Inc., Palm Beach, FL, USA, pp. 723-727.
8. Khalesi, B., Bonne, N., Stewart, M., Sharp, M. and Raidal, S. R. (2005). A comparison of haemoagglutination, haemoagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorriids. *J. Gen. Virol.*, 86:3039-3046.
9. Kondiah, K., Albertyn, J. and Bragg, R. R. (2005). Beak and feather disease virus haemoagglutinating activity using erythrocytes from African Grey parrots and Brown-headed parrots. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 72:263-265.
10. Pass, D. A. and Perry, R. A. (1984). The pathology of psittacine beak and feather disease. *Aust. Vet. J.*, 61:69-74.
11. Ritchie, P. A., Anderson, I. L. and Lambert, D. M. (2003). Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease virus among avian hosts. *Virology*, 306:109-115.

12. Schoemaker, N. J., Dorrestein, G. M., Latimer, K. S., Lumeij, J. T., Kik, M. J. L., van der Hage, M. H. and Campagnoli, R. P. (2000). Severe leukopenia and liver necrosis in young African Grey Parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian Dis.*, 44:470-478.
13. Shearer, P. L., Bonne, N., Clark, P., Sharp, M. and Raidal, S. R. (2008). Beak and feather disease virus infection in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Avian Pathol.*, 37(1):75-81.
14. Varsani, A., Regnard, G. L., Bragg, R., Hitzeroth, I. I. and Rybicki, E. P. (2011). Global genetic diversity and geographical and host species distribution of beak and feather disease virus isolates. *J. Gen. Virol.*, DOI: 10.1099/vir.0.028126-0.
15. Ypelaar, I., Bassami, M. R., Wilcox, G. E. and Raidal, S. R. (1999). A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet. Microbiol.*, 68: 141-148.

Tabella 1. Pappagalli oggetto dello studio.

Specie (Nome latino)	N° soggetti
Amazzone a redini rosse (<i>Amazona autumnalis</i>)	2
Amazzone dell'Amazonia (<i>Amazona amazonica</i>)	2
Amazzone farinosa (<i>Amazona farinosa</i>)	3
Amazzone e festiva (<i>Amazona festiva bodini</i>)	4
Amazzone fronte azzurra (<i>Amazona aestiva</i>)	12
Amazzone fronte gialla (<i>Amazona ochrocephala</i>)	15
Ara ali verdi (<i>Ara chloroptera</i>)	1
Ara di Illiger (<i>Ara maracana</i>)	4
Ara gialla e blu (<i>Ara ararauna</i>)	5
Ara ibrido	2
Ara macao (<i>Ara macao</i>)	3
Ara militare (<i>Ara militaris</i>)	4
Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)	9
Cacatua ciuffo giallo maggiore (<i>Cacatua galerita</i>)	15
Cacatua ciuffo giallo minore (<i>Cacatua sulphurea</i>)	2
Cacatua delle Molucche (<i>Cacatua moluccensis</i>)	2
Cacatua di Ducorps (<i>Cacatua ducorpsi</i>)	2
Cacatua di Goffin (<i>Cacatua goffini</i>)	2
Cacatua di Leadbeater (<i>Cacatua leadbeateri</i>)	2
Cacatua rosato (<i>Eolophus roseicapillus</i>)	1
Caicco testa nera (<i>Pionites melanocephala</i>)	1
Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	15
Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)	4
Conuro jandaya (<i>Aratinga jandaya</i>)	1
Ecletto (<i>Eclectus roratus</i>)	13
Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	7
Lori reticolato (<i>Eos reticolata</i>)	2
Lori testa nera (<i>Lorius lory</i>)	1
Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	14
Monaco (<i>Myopsitta monachus</i>)	3
Pappagallo accipitrino (<i>Deropterus accipitrinus</i>)	1
Pappagallo del Senegal (<i>Poicephalus senegalus</i>)	3
Parrocchetto a capo rosso (<i>Purpureicephalus spurius</i>)	1
Parrocchetto alessandrino (<i>Psittacula eupatria</i>)	9
Parrocchetto dai mustacchi (<i>Psittacula alexandri</i>)	4
Parrocchetto dal collare (<i>Psittacula krameri</i>)	30
Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	1
Totale	202

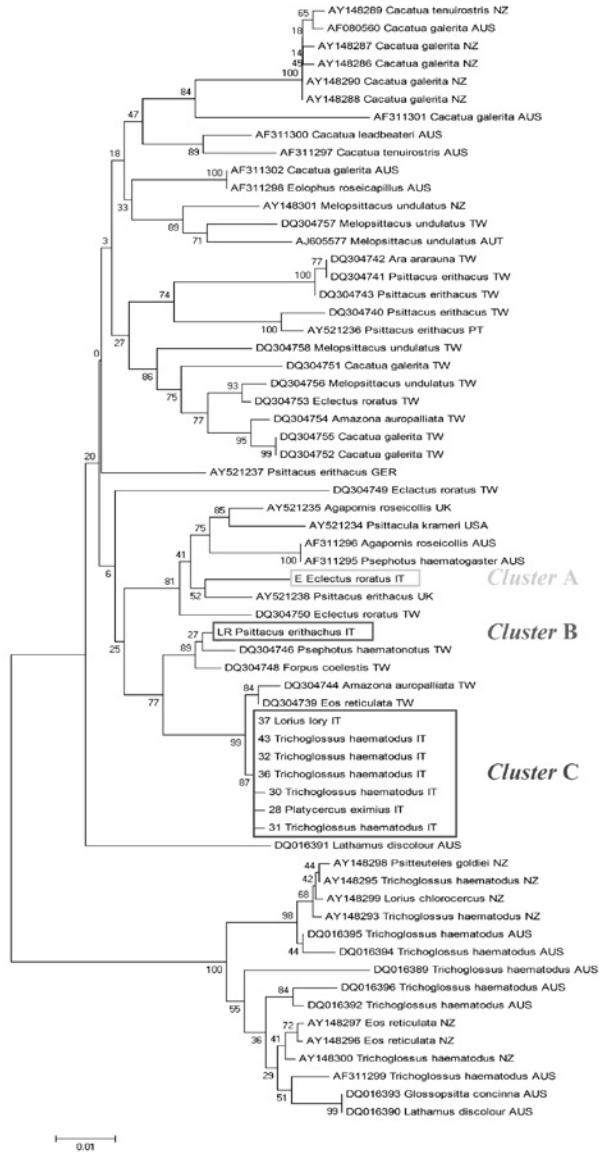
Tabella 2. Psittacidi deceduti compresi nello studio, dai quali la ricerca del *Circovirus* è stata effettuata a partire da organi e tessuti.

ID	Specie	Provenienza	Organo prelevato	Reperti necroscopici
FC	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (privato)	Fegato	Epatite, emorragie muscoli, pallore del miocardio
28	Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	Bergamo (privato)	Fegato Milza	Epatomegalia e splenomegalia
41	Lori reticolato (<i>Eos reticolata</i>)	Verona (pet shop)	Fegato	Epatite necrotizzante
42	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Verona (pet shop)	Fegato Rene	Epatite necrotizzante
43	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	Fegato	Epatite necrotizzante
VR	Caicco testa nera (<i>Pionites melanocephala</i>)	Verona (privato)	Fegato Intestino	Enterite emorragica
CEN	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Roma (privato)	Sangue	Non disponibili
PF	Parrocchetto capo rosso (<i>Purpureicephalus spurius</i>)	Ostuni (allevamento)	Fegato Cuore Penne Milza Reni Polmone Sangue	Ascaridi intestinali
LR	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Macerata (allevamento)	Cuore Reni Digerente Polmoni	Epatite necrotizzante
DAR	Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	Pordenone (privato)	Fegato Cuore Penne Reni Polmoni	Sospetta proventricolite micotica

Tabella 3. Campioni positivi per *Circovirus*.

ID	Specie	Provenienza	Sesso	Età	Note
28	Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	Bergamo (privato)	F	2 anni	Epatomegalia e splenomegalia
30	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	2 anni	
31	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	1 anno	
32	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	2 anni	
36	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	2 anni	
37	Lori testa nera (<i>Lorius lory</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	1 anno	
43	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (privato)	M	6 mesi	Epatite necrotizzante
LR	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Macerata (allevamento)	N.D.	5 mesi	Epatite necrotizzante
E	Ecletto (<i>Eclectus roratus</i>)	Perarolo (PD) (privato)	F	4 anni	Deplumazione avanzata

Figura 1. Albero filogenetico di 9 ceppi di BFDV isolati nel presente studio e 54 ceppi isolati a livello mondiale. L'albero è basato sulla sequenza nucleotidica del gene ORFV1, utilizzando MEGA4. Le lunghezze dei rami sono proporzionali alla differenza genetica stimata. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito.



* I ceppi analizzati nello studio sono identificati con la sigla IT e incorniciati. Il colore diverso e le lettere (A, B e C) identificano i tre *cluster* in cui sono contenuti i suddetti ceppi. Le sequenze scaricate da *Genbank* portano l'indicazione del numero di accesso, specie da cui sono state isolate e la sigla del Paese d'origine.

PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER* TERMOTOLLERANTI E RELATIVI FATTORI DI VIRULENZA IN ALZAVOLE (*ANAS CRECCA*)

Dipineto L., Gargiulo A., Sensale M., De Luca Bossa L.M., Russo T.P., Borrelli L., Calabria M., Menna L.F., Fioretti A.

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

Summary

This study was undertaken with the aim to evaluate the presence of *Campylobacter* spp. and related *cytholethal distending toxin* (*cdt*) genes in common teals (*Anas crecca*). To achieve this goal, cloacal swabs were collected from 70 common teals and analyzed by culture methods and polymerase chain reaction. In addition, *C. jejuni* were examined also for the presence of *wlaN* gene. This is believed to be the first report of *Campylobacter* spp. in common teal and our results confirm the very common occurrence of *C. jejuni* ($n = 40$) and *C. coli* ($n = 13$) in waterfowls. Furthermore, the *cdt* genes were frequently present in both *C. jejuni* and *C. coli* isolated. Moreover, seven *C. jejuni* isolates carried also the *wlaN* gene which is presumably involved in the expression of ganglioside mimics in Guillian-Barré syndrome.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Campylobacter* spp., in particolare *C. jejuni* e *C. coli*, è considerata una delle principali cause di tossinfezione alimentare in tutto il mondo. Nonostante la malattia si manifesti in forma moderata e autolimitante, possono verificarsi gravi complicanze post-infettive come la sindrome di Gullain-Barré (Humphrey *et al.*, 2007).

Il pollame è considerato il più importante vettore del *Campylobacter* spp. e agisce come principale fonte d'infezione per l'uomo. Infatti, il consumo di carne di pollame non adeguatamente cotta e la sua manipolazione non corretta sono la principale fonte d'infezione per l'uomo (Lee & Newell, 2006).

Sono stati studiati diversi fattori di virulenza importanti per l'induzione della gastroenterite, come la resistenza ai sali biliari, l'invasione delle cellule epiteliali e la produzione della *cytholethal distending toxin* (CDT) (Van Deun *et al.*, 2007). In particolare la CDT è una tossina codificata da tre subunità geniche chiamate *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (Samosornsuk *et al.*, 2007). CDT induce l'arresto nella fase G2/M del ciclo cellulare delle cellule eucariotiche, impedendo loro di entrare in mitosi, con conseguente morte cellulare (Zilbauer *et al.*, 2008). Inoltre, nell'ultimo decennio, è stato individuato un gene chiamato *wlaN* che è presumibilmente coinvolto nell'espressione della mimica gangliosidica nella sindrome Guillian-Barré (Linton *et al.*, 2000).

I dati in letteratura riguardo la diffusione del *Campylobacter* spp. nell'alzavola (*Anas crecca*) sono carenti. Per ovviare a tale mancanza, il presente studio è stato intrapreso con lo scopo di valutare la prevalenza del *Campylobacter* spp. nell'alzavola, i relativi geni codificanti la *cytholethal distending toxin*, nonché valutare l'eventuale riscontro del gene *wlaN*.

MATERIALI E METODI

Catture e Campionamento

Sono stati raccolti tamponi cloacali da 70 alzavole adulte durante il periodo di svernamento (*i.e.* Gennaio 2009). Questa dimensione del campione è stata calcolata con la formula proposta da Thrusfield (1995) utilizzando i seguenti valori: popolazione oggetto di indagine (circa 1500 alzavole), prevalenza attesa (5%), intervallo di confidenza (95%) e precisione desiderata (5%). Il prelievo è stato effettuato nelle zone umide dell'Oasi WWF di Serre-Persano situata nella parte meridionale della regione Campania. Gli uccelli sono stati catturati mediante l'impiego di *mist-net* e trappole tunnel. Ogni alzavola è stata campionata singolarmente usando un tampone cloacale sterile, marcata con anello e poi rilasciata. Le procedure di inanellamento sono state eseguite dall'Associazione Studi Ornitologici Italia Meridionale (ASOIM). Le procedure di manipolazione degli uccelli sono state eseguite secondo le linee guida dell'*Office of Animal Care and Use*.

Isolamento e identificazione

I tamponi cloacali sono stati inoculati in *Campylobacter selective enrichment broth* (Oxoid Ltd, Milano), incubati a 42°C per 48 ore in condizioni microaerofile fornite dal CampyGen (Oxoid) e processati seguendo la procedura ISO 10272:2006. Le colonie identificate presuntivamente come *Campylobacter* spp., al microscopio ottico, sono state sottoposte alla *polymerase chain reaction* (PCR). L'individuazione specifica del genere *Campylobacter* si basava sull'amplificazione del gene *cadF* utilizzando i primer *cadF2B*, e *cadR1B* come descritto da Konkel *et al.* (1999). Tutti gli estratti di DNA sono stati esaminati, mediante triplex PCR, per valutare le specie *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* utilizzando i primer e le condizioni di PCR descritti da Khan & Edge (2007). I prodotti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% (Gibco-BRL, Milano), colorati con bromuro di etidio e visualizzati sotto luce UV. I campioni positivi per *C. jejuni* e *C. coli* sono stati esaminati anche per la presenza dei geni veicolanti la CDT (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, e *cdt* cluster) utilizzando i primer e le procedure descritte da Bang *et al.* (2003). Infine, i campioni positivi al *C. jejuni* sono stati esaminati anche per valutare la presenza del gene *wlaN* secondo quanto riportato da Talukder *et al.* (2008).

RISULTATI

Su 70 alzavole esaminate, 42 (60.0%; 95% intervallo di confidenza (CI) = 47.6-71.3%) erano positive a *Campylobacter* spp. Come dimostrato dalla triplex PCR effettuata per identificare la presenza delle specie *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, *C. jejuni* sono stati ritrovati in 40 su 42 (95.2%; 95% CI = 82.6 - 99.2%) campioni positivi e *C. coli* sono stati ritrovati in 13 su 42 (30.9%; 95% CI = 18.1 - 47.2%) campioni positivi. Al contrario, *C. lari* non è mai stato ritrovato.

Per quanto riguarda la CDT, tutti i *C. jejuni* isolati veicolavano i geni *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *cdt* cluster e tutti i *C. coli* isolati veicolavano i geni *cdtB* e *cdt* cluster ad eccezione di tre ceppi di *C. coli* che non veicolavano nessuno dei due geni *cdtA* e *cdtC*. Per quanto riguarda il gene *wlaN* ricercato per *C. jejuni*, sette ceppi veicolavano il gene *wlaN*.

DISCUSSIONE

Le specie aviarie sono considerate il principale serbatoio di questo microrganismo che è stato, infatti isolato sia da uccelli domestici che selvatici ma mai dall'alzavola (Van Dyke *et al.*, 2010). I risultati del presente studio, in cui si è ottenuta una prevalenza di *Campylobacter* spp. del 60%, sono in linea con gli isolamenti effettuati in altri uccelli acquatici segnalati da altri autori (Nonga & Muhairwa, 2010; Colles *et al.* 2008). Per nostra conoscenza, questo è il primo studio che valuta la prevalenza di *Campylobacter* spp. nell'alzavola, confermando, quindi, il ruolo degli uccelli acquatici come vettore di questo patogeno.

Per quanto riguarda la CDT, i nostri risultati confermano l'elevata prevalenza dei geni *cdtA*, *cdtB*, e *cdtC* in *C. jejuni*, dato coerente con i risultati di precedenti studi (Pickett *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2006). Per quanto riguarda *C. coli*, non tutti gli isolati veicolavano i geni *cdtA* e *cdtC* anche se tutti i *C. coli* isolati risultavano positivi alla PCR usando i primer del *cdt* cluster. Questi risultati sono in accordo con Ripabelli *et al.* (2010) che ha segnalato la presenza di diversi errori nelle sequenze dei primer usate per l'identificazione dei geni della CDT e del *C. coli*.

Diversi studi hanno descritto la presenza di geni *cdt* veicolati dai *Campylobacter* isolati da diverse fonti (Bang *et al.*, 2003; Van Deun *et al.*, 2007). Poco, invece, è noto sulla presenza dei geni codificanti la tossina e sulla presenza di *Campylobacter* isolati da uccelli acquatici. Pertanto, i risultati qui presentati suggeriscono che i geni *cdt* possono essere presenti anche in *C. jejuni* e in *C. coli* isolati dall'alzavola.

Degna di nota è l'individuazione del gene *wlaN* in quanto è presumibilmente coinvolto nell'espressione della mimica gangliosidica della sindrome di Guillian-Barrè (Linton *et al.*, 2000). È interessante notare come la prevalenza (17,5%) di questo gene veicolato da *Campylobacter* spp. isolati nell'alzavola è simile a quella evidenziata in studi condotti su carne di pollame (23.8 %) e su campioni clinici umani (25.0 %) come riferito da Datta *et al.* (2003).

CONCLUSIONI

I risultati della presente indagine sottolineano l'elevata prevalenza di *Campylobacter* spp. nell'alzavola e, poiché questo uccello acquatico vive in zone umide, il *Campylobacter* spp. può essere facilmente trasmesso ad altri uccelli acquatici ed esseri umani tramite l'acqua e/o per contatto diretto. Infatti, Varslot *et al.* (1996) descrisse due epidemie da *C. jejuni* in Norvegia la cui causa venne individuata nella contaminazione di acqua potabile da feci di oche dalle zampe rosse. Inoltre, nella Regione Campania, le alzavole vengono a contatto sia con altri animali che con l'uomo, in particolare durante la stagione venatoria. Possiamo concludere, quindi, che le alzavole, in quanto uccelli migratori, hanno un ruolo epidemiologico importante nella diffusione di *Campylobacter* spp. su ampi territori.

BIBLIOGRAFIA

1. Bang DD, Nielsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Handberg K, and M Madsen. (2003). PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1003-1014.
2. Colles FM, Dingle KE, Cody AJ, and MC Maiden. (2008). Comparison of *Campylobacter* populations in wild geese with those in starlings and free-range poultry on the same farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3583-3590.
3. Datta S, Niwa H, and K Ito. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 52: 345-348.
4. Humphrey T, O'brien S, and M Madsen. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 237-257.
5. Khan IUH, and TA Edge. (2007). Development of a novel triplex PCR assay for the detection and differentiation of thermophilic species of *Campylobacter* using 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2561-2569.
6. Konkel ME, Gray SA, Kim BJ, Garvis SG, and J Yoon. (1999). Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *J. Clin. Microbiol.* 37: 510-517.
7. Lee MD, and DG Newell. (2006). *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis.* 50: 1-9.
8. Linton D, Gilbert M, Hitchen PG, Dell A, Morris HR, Wakarchuk WW, Gregson NA, and BW Wren. (2000). Phase variation of a beta-1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 37: 501-514.
9. Martínez I, Mateo E, Churrua E, Girbau C, Alonso R, and A Fernández-Astorga. (2006). Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 45-48.
10. Nonga HE, and AP Muhairwa. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* isolates from free range domestic duck (*Cairina moschata*) in Morogoro municipality, Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 42: 165-172
11. Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, and H Zeytin. (1996). Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect. Immun.* 6: 2070-2078.
12. Ripabelli G, Tamburro M, Minelli F, Leone A, and ML Sammarco. (2010). Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 355-364.
13. Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Nishimura K, Eampokalap B, Phongsisay V, Chaicumpa W, and S Yamasaki. (2007). Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol. Immunol.* 51: 909-917.

14. Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S, Nur-E-Kamal A, Nair GB, Cravioto A, Sack DA, and HP Endtz. (2008). Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1485-1488.
15. Thrusfield M. (1995). Surveys. In: Thrusfield M. (Ed.), *Veterinary Epidemiology*, Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 178-198.
16. Van Deun K, Haesebrouck F, Heyndrickx M, Favoreel H, Dewulf J, Ceelen L, Dumez L, Messens W, Leleu S, Van Immerseel F, Ducatelle R, and F Pasmans. (2007). Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.* 56: 1284-1289.
17. Van Dyke MI, Morton VK, McLellan NL, and PM Huck. (2010). The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1053-1066.
18. Varslot M, Resell J, and IG Fostad. (1996). Water-borne *Campylobacter* infection probably caused by pink-footed geese. Two outbreaks in Nord-Trøndelag, Stjørdal in 1994 and Verdal in 1995. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 116: 3366-3369.
19. Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW, and M Bajaj-Elliott. (2008). *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 123-129.

PRIMA SEGNALEZIONE DELLA PRESENZA DI INTEGRONI DI CLASSE 1 E 2 IN *E. COLI* ISOLATI DA TACCHINI DA CARNE

Dotto G.¹, Giovanardi D.², Giacomelli M.¹, Grilli G.³, Piccirillo A.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020, Legnaro (Padova)

²Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina, 3 - 37132, San Michele Extra, Verona

³Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano, Via Celoria, 10 - 20133 Milano

Summary

The aim of this study was to determine the presence of class 1 and class 2 integrons in multi-drug resistant *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) isolated from diseased turkeys. Notoriously, class 1 and class 2 integrons play an important role in the selection of multidrug-resistant bacteria by facilitating the diffusion of antimicrobial resistance genes. Forty-eight multidrug-resistant strains were collected from commercial turkeys affected by colibacillosis and screened for the presence of integrons and associated gene cassettes. Eight isolates harbored class 1 integrons and 9 strains class 2 integrons. The gene cassettes combination most commonly found was *dfrA1-aadA1* and *dfrA1-sat2-aadA1* in class 1 and class 2 integrons, coding for aminoglycoside and trimethoprim resistance. One class 1 integron positive isolate carried a rare type of gene cassette arrangement (*estX-aadA1*). This study reports for the first time the presence of class 1 and 2 integrons in *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) isolates from commercial turkeys.

INTRODUZIONE

La colibacillosi aviaria è un'infezione localizzata o sistemica provocata da *Escherichia coli*, batterio comunemente presente nella flora intestinale di varie specie animali, avicoli compresi. Questo batterio è uno dei principali responsabili di danni economici per mortalità nell'allevamento del tacchino. Nonostante esistano numerosi ceppi dotati di notevole patogenicità (*Avian Pathogenic E. coli* - APEC), negli avicoli non risulta che essi siano, salvo rare eccezioni, agenti primari di malattia ma piuttosto di patologie secondarie ad infezioni virali o ad errate pratiche di allevamento (Barnes *et al.*, 2008).

Il controllo di tale patologia può essere affrontato eliminando o attenuando i fattori predisponenti, impedendo l'ingresso di *E. coli* patogeni negli allevamenti oppure controllando direttamente l'agente eziologico mediante appropriati trattamenti farmacologici. Data la difficoltà nel controllo dei fattori predisponenti e scatenanti tale patologia, la terapia con antibiotici e chemioterapici è certamente la via che più comunemente viene intrapresa negli allevamenti intensivi. Tuttavia, nonostante l'indubbia utilità nel controllo della colibacillosi e di altre forme batteriche, negli anni si è presa coscienza dei limiti che la terapia farmacologica può presentare a causa della progressiva selezione di batteri antibiotico-resistenti (Gyles, 2008). Infatti, oltre ad una resistenza naturale che i batteri possono presentare per una o

più classi di farmaci grazie alle loro caratteristiche intrinseche, nelle popolazioni batteriche stanno sempre più diffondendosi resistenze di tipo acquisito mediante trasferimento genetico orizzontale da parte di plasmidi, trasposoni e integroni oppure mediante mutazioni genetiche trasferibili solo verticalmente (Carattoli, 2001).

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi volti alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno, in particolare delle strutture geniche coinvolte nella trasmissione orizzontale tra specie batteriche di geni di resistenza agli antibiotici. Infatti, l'elevata diffusione di resistenza nei batteri Gram-negativi è dovuta principalmente al trasferimento orizzontale di determinanti di resistenza attraverso elementi mobili di DNA, quali plasmidi, trasposoni e integroni (Carattoli, 2001; Carattoli, 2003). In particolare, l'associazione tra geni cassetta e integroni è stata fondamentale nel determinare la comparsa e la diffusione della multifarmaco-resistenza, intesa come resistenza contemporanea a più antibiotici di diversa famiglia. Infatti, i batteri Gram-negativi che mostrano fenotipo di resistenza multiplo spesso presentano plasmidi che veicolano geni di resistenza mediante gli integroni.

Gli integroni sono elementi genetici capaci di acquisire geni di resistenza agli antibiotici sotto forma di cassette. Essi presentano un gene codificante un'integrasi (*intI*), seguito da uno o più promotori e da un sito di ricombinazione, *attI*, in cui i determinanti genici di resistenza, sotto forma di cassette, possono esser inseriti o escissi grazie ad un meccanismo di ricombinazione sito-specifico catalizzato dall'integrasi stessa (Lévesque, 1995). La classificazione degli integroni si basa sul grado di omologia della sequenza del gene codificante per l'integrasi *intI* e, delle cinque classi finora descritte, la classe 1 sembra essere la più diffusa nei batteri Gram-negativi.

Data l'importanza che tali strutture geniche svolgono nel trasferimento orizzontale tra batteri di geni responsabili della resistenza agli antibiotici, sono stati condotti diversi studi volti alla ricerca e all'analisi degli integroni e delle cassette geniche in essi contenute, sia in ceppi batterici commensali sia patogeni. Tuttavia, dalla letteratura emerge come la maggior parte degli studi si riferisca principalmente a studi condotti sia su batteri isolati da casi clinici umani che commensali e, in ambito veterinario, su batteri isolati da derrate di origine animale (Soufi *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2010; Unno *et al.*, 2010). Scarse sono invece le informazioni in merito alla diffusione di tali strutture in ceppi di *E. coli* circolanti negli allevamenti intensivi, soprattutto avicoli (Smith *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009).

Lo studio e il monitoraggio dell'antibiotico-resistenza sia da un punto di vista fenotipico che genotipico negli animali è fondamentale non soltanto perché tale fenomeno può compromettere l'efficacia dei trattamenti terapeutici delle infezioni in atto negli allevamenti, ma soprattutto per la possibile diffusione orizzontale dei determinanti genici di resistenza in ceppi commensali normalmente residenti nell'intestino animale e, conseguentemente, nell'ambiente circostante (Ozaki *et al.*, 2011).

L'obiettivo del nostro studio è stato dunque rivolto alla ricerca degli integroni di classe 1 e 2 in ceppi di *E. coli* APEC multifarmaco-resistenti isolati da tacchini da carne affetti da colibacillosi allevati nel Nord-Italia.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Lo studio ha coinvolto tre cicli produttivi consecutivi, dello stesso allevamento, di tacchini da carne maschi di età compresa tra la prima e la quattordicesima settimana di vita. Durante questo periodo, le carcasse degli animali deceduti sono state sottoposte a necropsia e qualora le lesioni fossero compatibili con colisetticemia, sono stati prelevati i visceri e/o gli essudati (liquido pericardico e articolare) per l'indagine batteriologica.

Prelievi per l'isolamento batteriologico di Escherichia coli

L'isolamento di *Escherichia coli* è stato eseguito solo qualora le condizioni della carcassa permettessero una corretta diagnosi (carcassa fresca o animale sottoposto a eutanasia in laboratorio).

La tecnica adottata prevedeva una sterilizzazione con flambatura della superficie del parenchima dell'organo (es. fegato, cervello) e il prelievo del campione da seminare con tampone sterile o con ansa di platino o monouso. Quando erano presenti lesioni fibrino-purulente, i campioni da seminare sono stati prelevati da pericardio, sacchi aerei e articolazioni.

Terreni di coltura e test biochimici di conferma per Escherichia coli

Per l'isolamento di *Escherichia coli* sono stati utilizzati sia terreni generici che selettivi e differenziali. Nello specifico, il terreno Eosin Methylene Blue (EMB - Levine) è stato utilizzato in abbinamento al terreno agar sangue (5 % di sangue di montone) che è in grado di differenziare ceppi di *E. coli* emolitici da altri batteri patogeni. *E. coli* sul terreno EMB cresce sottoforma di colonie verdi metalliche (ceppi lattosio positivi) o di colore rosa (ceppi lattosio negativi). Dopo la semina dei tamponi o dei visceri, i terreni sono stati incubati 24 ore in aerobiosi a 37 °C. Se le piastre di primo isolamento presentavano numerose colonie sospette di *E. coli*, si sono prelevate alcune di essere per l'inoculo in TSI agar. Dalle colonie cresciute su TSI sono state eseguite la colorazione di Gram e il test ossidasi. Su TSI agar questi batteri producono una reazione acida/acida (becco/fondo), compresi i ceppi lentamente lattosio fermentanti, con presenza di gas ma non di H₂S. Le colonie sospette sono state confermate in via definitiva con galleria biochimica miniaturizzata (RapID 32 E - Biomerieux, Montpellier, Francia).

Per la loro conservazione, tutti gli isolati di *E. coli* sono stati inoculati in provette dedicate e mantenuti in congelatore a -70 °C.

Tipizzazione sierologica

Gli *E. coli* isolati sono stati sottoposti a tipizzazione sierologica mediante tecnica di agglutinazione rapida su vetrino con antisieri O1:K1, O2:K, O78:K (VLA Laboratories, Weybridge, UK). Se non tipizzabili con questi antisieri, i ceppi sono stati inviati al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'IZS della Lombardia e Emilia Romagna. La tecnica utilizzata presso questa struttura è quella proposta da Blanco e Blanco (1993) con l'identificazione di 37 antigeni somatici O (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O73, O75, O78, O83, O86, O88, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157).

Valutazione dell'antibiotico-sensibilità mediante tecnica di Kirby-Bauer

Tutti i ceppi di *E. coli* isolati sono stati valutati per la resistenza ad antibiotici specifici (resistotipo). La tecnica utilizzata è quella proposta dalla norma CLSI M2-A9 (2006) con inoculo della sospensione batterica su Mueller-Hinton agar e incubazione a 37°C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. I principi attivi degli antibiotici utilizzati sono: colistina (CT), apramicina (APR), gentamicina (CN), amoxicillina (AML), ampicillina (AMP), trimetoprim+sulfametossazolo (SXT), enrofloxacin (ENR) e ossitetraciclina (OT).

In un secondo momento è stata valutata anche la sensibilità a un secondo *panel* di antibiotici: streptomina (S), spectinomina (SH), triple-sulfa (SSS) e cloramfenicolo (CAT), per verificare la corrispondenza tra resistotipo e le cassette geniche di resistenza più frequentemente veicolate dagli integroni.

Estrazione del DNA genomico

I ceppi di *E. coli* isolati sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico mediante shock termico (Maguire *et al.*, 2001). L'estrazione del DNA è stata eseguita sospendendo un'ansata di cultura batterica in 200 µl d'acqua ultrapura sterile e sottoponendola a due cicli di bollitura di 10 minuti ciascuno intervallati da una fase di congelamento di 5 minuti.

La sospensione è stata conservata a -20°C fino all'esecuzione delle successive indagini molecolari.

Ricerca degli integroni di classe 1 e 2

I ceppi di *E. coli*, isolati e caratterizzati fenotipicamente, sono stati sottoposti ad una prima fase di *screening* mediante *real-time* PCR per il rilievo della presenza di integroni di classe 1 e 2.

La ricerca degli integroni di classe 1 e 2 è stata eseguita mediante *real-time* PCR con *Sybr Green dye* come descritto, salvo lievi modifiche, da Ekkapobyotin *et al.* (2008). Per la standardizzazione della metodica sono stati utilizzati come controlli positivi ceppi di *E. coli* gentilmente forniti dal Dr. Schwarz del Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee, Germania.

Le prove sono state eseguite con LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics), alle seguenti condizioni: QuantiTect Sybr Green PCR Master Mix 1X (Qiagen), 0,3 µM di ciascun *primer* e 100 ng di DNA in un volume totale di 10 µl. L'amplificazione prevede 1 ciclo di denaturazione iniziale a 95 °C per 15 minuti, denaturazione a 94°C per 10 secondi, *annealing* a 55°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 30 secondi per un totale di 40 cicli.

Amplificazione della regione variabile

I ceppi risultati positivi per gli integroni di classe 1 e/o 2 sono stati quindi sottoposti ad amplificazione della regione variabile in essi contenuta mediante *end-point* PCR.

Per quanto riguarda i ceppi positivi agli integroni di classe 1, il protocollo applicato segue, salvo lievi modifiche, quello descritto da Lévesque *et al.* (1995) che prevede l'amplificazione della regione variabile contenuta negli integroni di classe 1 a partire dalle regioni conservate (CS) in 3' e 5'.

Per quanto riguarda invece i ceppi positivi agli integroni di classe 2, il protocollo applicato prevede l'utilizzo di una coppia di *primer* consigliata da White (2001) per

l'amplificazione della regione variabile contenuta negli integroni di classe 2 a partire da *attI2* e *orfX*.

In genere, ogni reazione è stata allestita con la seguente composizione: 1X PCR buffer (Invitrogen), 2 mM di MgSO₄, 0.2 mM di ciascun nucleotide trifosfato, 25 pmol di ciascun *primer*, 1 unità di HF Platinum[®] Taq DNA *polymerase* e 100 ng di DNA in un volume totale di 50 µl. Le condizioni di amplificazione prevedono 40 ripetizioni del ciclo, caratterizzato da una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una di appaiamento dei *primer* a 55°C per 30 secondi ed una di allungamento a 68°C per 5 minuti, precedute da una denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti.

Per ogni reazione sono sempre stati inclusi un controllo positivo e uno negativo per il controllo della reazione.

Sequenziamento delle cassette geniche

I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il kit Nucleospin[®] Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) attenendosi alle istruzioni riportate dal produttore. I frammenti sono stati sequenziati in entrambe le direzioni presso il centro BMR Genomics di Padova con il sequenziatore automatico ABI 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le sequenze nucleotidiche sono state poi analizzate e assemblate utilizzando rispettivamente i software *FinchTV* versione 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) e *ChromasPro*, versione 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Australia).

E' stata poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze ottenute con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il server BLAST del database NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), al fine di identificare le cassette geniche contenute nella regione variabile di ciascun integrone.

Analisi statistica

I risultati del test di sensibilità agli antimicrobici sono stati valutati statisticamente mediante il test del chi-quadrato (χ^2) e il test esatto di Fisher.

RISULTATI

Esame batteriologico

Le carcasse sottoposte a necropsia sono state 37. In totale sono stati isolati 48 ceppi di *E. coli* così suddivisi: 10 nel primo ciclo, 28 nel secondo e 10 nel terzo. Tutti risultavano non emolitici su agar sangue e 46 di essi con una chiara crescita verde metallica su EMB agar (ceppi lattosio positivi). Solamente due risultavano lattosio negativi e su questo terreno si presentavano con colonie rosa.

La maggior parte degli *E. coli* è stata isolata dal cervello (46%) seguita da liquido pericardico (15%) e polmone (15%). Di particolare interesse diagnostico l'isolamento del batterio dalle articolazioni coxofemorali e tibiotarsiche da soggetti con difficoltà di deambulazione.

Tipizzazione sierologica

La maggior parte dei ceppi risultava del sierotipo O78 (58%) e O2 (29%). Interessante è l'isolamento di un ceppo sierotipo O111 durante il primo ciclo. A conoscenza degli autori si tratta del primo isolamento in questa specie, mentre risulta già segnalato nel pollo (Zanella, 2000).

Valutazione dell'antibiotico-sensibilità mediante tecnica di Kirby-Bauer

I risultati degli antibiogrammi, riferiti agli antibiotici del primo *panel*, sono riportati nelle Tabelle 1 e 2. È stata riscontrata una notevole resistenza all'ossitetraciclina, con il 100% dei ceppi resistenti in tutti i cicli produttivi, e a enrofloxacin, amoxicillina e ampicillina (dall'80 al 100% dei ceppi resistenti a seconda del ciclo). Tutti i ceppi testati erano invece sensibili alla colistina, e la quasi totalità degli stessi era sensibile anche agli aminoglicosidi (100% di sensibilità ad aminosidina ed apramicina in tutti i cicli produttivi, dal 96% al 100% nei confronti della gentamicina a seconda del ciclo). Nei confronti dell'associazione trimethoprim e sulfametossazolo è prevalsa nettamente la sensibilità nel 1° ciclo (90% degli isolati), nel 2° la percentuale di ceppi sensibili era solo leggermente superiore (pari al 57%) a quella dei ceppi resistenti, mentre tutti i ceppi isolati dal 3° ciclo erano resistenti. Questa differenza nella sensibilità nei confronti dell'associazione di trimethoprim e sulfametossazolo tra i diversi cicli è risultata statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tutti i sierotipi hanno mostrato un profilo di sensibilità simile nei confronti della maggior parte degli antimicrobici testati, con la sola eccezione dell'associazione di trimethoprim e sulfametossazolo (con differenze tra tutti i sierotipi) e delle penicilline (con il profilo del sierotipo O111 diverso rispetto a quello degli altri sierotipi). In tutti i sierotipi prevaleva la sensibilità nei confronti degli aminoglicosidi (dal 96% al 100%) e della colistina, con tutti i ceppi sensibili nei confronti di questa molecola. Al contrario, tutti gli isolati erano resistenti all'ossitetraciclina e la maggior parte di essi anche all'enrofloxacin, con il 100% di resistenza nell'ambito dei sierotipi O78 e O111, l'80% tra i non tipizzabili e il 79% tra gli isolati del sierotipo O2. La resistenza è prevalsa anche nei confronti delle penicilline, con tutti i ceppi del sierotipo O78, tutti i non tipizzabili e il 93% degli isolati del sierotipo O2 resistenti nei confronti di amoxicillina ed ampicillina. L'unico ceppo del sierotipo O111, isolato durante il secondo ciclo produttivo, era invece sensibile a queste molecole. Le differenze tra sierotipi nella sensibilità ad amoxicillina, ampicillina e a trimethoprim+sulfametossazolo sono statisticamente significative ($p < 0,05$).

Ricerca degli integroni di classe 1 e 2 e identificazione delle cassette geniche

Su un totale di 48 ceppi di *E. coli* testati, 8 sono risultati positivi agli integroni di classe 1 (17%) e 9 agli integroni di classe 2 (19%). La maggior parte dei ceppi portatori di integroni di classe 1 sono stati isolati da tacchini appartenenti al secondo ciclo di allevamento (7 ceppi sugli 8 isolati, 87,5%), mentre 8 ceppi su 9 (89%) degli isolati di *E. coli* positivi agli integroni di classe 2 provenivano da animali del terzo ciclo produttivo. Nessun ceppo isolato da animali appartenenti al primo ciclo di allevamento è risultato positivo alle due classi di integroni. Inoltre, la maggioranza degli isolati di *E. coli* tipizzati sierologicamente e veicolanti le succitate strutture geniche, appartenevano al sierotipo O2 (11 su 16 isolati; 69%) e mostravano lo stesso profilo di resistenza agli antibiotici amoxicillina, ampicillina, trimethoprim-sulfametossazolo, enrofloxacin e ossitetraciclina, triple-sulfa e streptomycin e/o spectinomycin, ad eccezione di un unico ceppo resistente a gentamicina e sensibile a trimethoprim-sulfametossazolo (Tabella 3).

Per quanto riguarda gli integroni di classe 1, l'amplificazione ed il successivo sequenziamento della regione variabile hanno evidenziato la presenza di frammenti di dimensioni comprese tra 1000 bp e 1800 bp, ad eccezione di 2 ceppi per i quali non

è stato possibile amplificare la regione variabile. Le cassette geniche più frequenti sono state la combinazione dei geni *aadA1* e *dfrA1* codificanti rispettivamente per *aminoglycoside 3'-adenyltransferase* e *dihydrofolate-reductase* e responsabili della resistenza ad alcuni aminoglicosidi (streptomina e spectinomicina) e al trimetoprim. Tuttavia, oltre a questa combinazione genica, è stata evidenziata la presenza di una singola cassetta *aadA1* e la combinazione dei geni *aadA1- estX* (quest'ultimo codificante per un'ipotetica esterasi/idrolasi la cui funzione è ad oggi sconosciuta), rispettivamente nell'unico ceppo di *E. coli* positivo per entrambe le classi di integroni e nell'unico isolato veicolante tali strutture appartenente al sierotipo O78 e resistente alla gentamicina (Tabella 3).

L'amplificazione e il sequenziamento della regione variabile degli integroni di classe 2 hanno invece permesso di evidenziare la presenza di frammenti di dimensioni di circa 2000 bp, tutti contenenti la combinazione di cassette geniche *dfrA1-sat2-aadA1* responsabili rispettivamente della resistenza alla streptomina e spectinomicina (*aadA1*), streptotricina (*sat2*) e trimetoprim (*dfrA1*). Unica eccezione, l'integrone di classe 2 presente nel ceppo positivo ad entrambe le classi che presentava una regione variabile di poco superiore alle 1000 bp e contenente la stessa cassetta veicolata dall'integrone di classe 1 (*aadA1*) ed un frammento di circa 100 bp del gene *sat2* (Tabella 3).

DISCUSSIONE

Avian Pathogenic E. coli sono considerati i principali patogeni responsabili di infezioni extra-intestinali nelle specie avicole. Tali infezioni sono note con il termine di colibacillosi e rappresentano una delle principali cause di danni economici per mortalità negli allevamenti intensivi di tacchini da carne. Oltre alle problematiche legate a una zootecnia di tipo intensivo, la diffusione del fenomeno della resistenza ai più comuni antibiotici aggiunge un'ulteriore difficoltà al controllo di tale patologia. L'obiettivo del presente lavoro era quello di approfondire le conoscenze sull'argomento e determinare le resistenze maggiormente diffuse nei ceppi di *E. coli* patogeni isolati da allevamenti di tacchini da carne indagando nel contempo la presenza di particolari determinanti genici di resistenza agli antibiotici.

Tutti i ceppi di *E. coli* sono stati isolati da casi clinici con malattia conclamata e sono stati sottoposti ad antibiogramma per verificare la frequenza di antibiotico-resistenza in rapporto anche alla presenza di integroni. I profili fenotipici di resistenza di tutti i campioni sono stati definiti mediante l'allestimento di antibiogrammi con un *panel* di antibiotici scelti tra quelli più comunemente utilizzati nella terapia della colibacillosi nel tacchino. Inoltre, al fine di verificare la base molecolare di resistenza mediata dalla presenza di integroni, sono stati testati anche gli antibiotici i cui determinanti di resistenza sono frequentemente veicolati da tali strutture geniche. A tali antibiotici è stato aggiunto anche il cloramfenicolo, nonostante sia un antimicrobico vietato da molti anni nella terapia delle infezioni batteriche in campo veterinario.

Tra le resistenze riscontrate, le più frequenti erano quelle nei confronti di ossitetraciclina, penicilline, enrofloxacin e dell'associazione trimetoprim e sulfametossazolo. Anche se presente in un numero limitato di ceppi, non è trascurabile la resistenza al cloramfenicolo.

Per quanto riguarda le tetracicline, tra i principi attivi più vecchi, sono però notoriamente inefficaci nei confronti di *E. coli* la cui resistenza è nota anche in ceppi

provenienti da specie animali diverse dagli avicoli, anche grazie alla diffusa presenza di geni di resistenza per questi antibiotici (Wilkerson *et al.*, 2004).

Da questa indagine risulta che enrofloxacin, fluorochinolone utilizzato in zootecnia da diversi anni, ha perso progressivamente di efficacia. Questi dati concordano con quanto segnalato da van den Bogaard (2001) in polli, tacchini e galline ovaiole in Olanda e da Gyles (2008) in Canada. Anche i β -lattamici risultano particolarmente inefficaci e ciò è particolarmente importante in quanto va ricordato che questi antibiotici o altri appartenenti alla stessa classe, vengono utilizzati frequentemente anche in campo umano. A tale riguardo la possibilità della resistenza crociata tra antimicrobici appartenenti alla stessa famiglia chimica, l'AFSAA (2006) in Francia, pone particolare attenzione al consumo di antibiotici e mette in risalto soprattutto le molecole che vengono utilizzate sia in veterinaria che in medicina umana, sconsigliando vivamente questa sovrapposizione.

Un fenotipo multi-resistente, definito come resistenza verso almeno tre antibiotici di classi diverse, è stato riscontrato nella maggioranza dei ceppi considerati, compresi tutti i 16 isolati contenenti integroni. Di particolare rilievo è la resistenza dimostrata sia fenotipicamente sia genotipicamente dai ceppi portatori di integroni nei confronti di sulfamidici, trimethoprim ed aminoglicosidi. Infatti, l'analisi delle cassette geniche contenute in queste strutture, evidenzia la presenza di determinanti genici di resistenza a tali antibiotici. Tutti i ceppi positivi agli integroni di classe 1, infatti, presentano nella regione conservata 3'CS il gene *sul1* responsabile della resistenza ai sulfamidici. Inoltre, tutti i ceppi i cui integroni contenevano nella regione variabile le cassette geniche *aadA1* o la combinazione *aadA1-dfrA1*, responsabili rispettivamente della resistenza alla streptomicina/spectinomicina e al trimethoprim, risultavano fenotipicamente resistenti a tali molecole. È degna di nota la relazione tra il significativo aumento della resistenza a trimethoprim+sulfametossazolo e il progressivo riscontro della presenza di integroni con l'avanzare dei cicli produttivi. Altrettanto significativo è il rilievo della maggior percentuale di ceppi resistenti a trimethoprim+sulfametossazolo tra gli isolati del sierotipo O2, nei quali è stato riscontrato il maggior numero di integroni.

Particolarmente interessante è il campione 410-1, l'unico ceppo di *E. coli* O78 portatore di un integrone di classe 1. La regione variabile di tale struttura presentava la combinazione dei geni cassetta *estX - aadA1*. Mentre il gene *aadA1* è particolarmente frequente in tali strutture geniche ed è notoriamente responsabile della resistenza alla streptomicina/spectinomicina, il gene *estX* è spesso correlato agli integroni di classe 2, ma solo raramente è stato riscontrato negli integroni di classe 1 (Literak *et al.*, 2009). Questo gene codifica per un'ipotetica esterasi/idrolasi la cui funzione non è ancora nota. Sembra tuttavia simile a un frammento del gene *sat1* codificante per un'*acetyl-transferase* responsabile della resistenza a streptomicina (Partridge, 2005). Da notare inoltre che la presenza di questo particolare arrangiamento genico è presente nell'unico ceppo di *E. coli* risultato resistente alla gentamicina.

Come già accennato precedentemente, non è stato possibile amplificare la regione variabile degli integroni di classe 1 di due ceppi di *E. coli* risultati positivi alla prima fase di *screening* mediante *real-time* PCR. Questo risultato può essere espressione di una regione variabile vuota, priva di cassette geniche. Questi campioni saranno comunque oggetto di indagini future in quanto non si esclude la possibilità che tali integroni siano delle strutture atipiche con delezioni o mutazioni a carico delle regioni

conservate 3' e 5', tali da non permettere l'appaiamento dei *primer* utilizzati nella reazione di amplificazione (Dawes *et al.*, 2010).

Le correlazioni tra il profilo fenotipico e genotipico di antibiotico-resistenza evidenziate nei ceppi di *E. coli* positivi agli integroni di classe 1 sono state riscontrate anche negli isolati positivi agli integroni di classe 2. Particolarmente interessante è l'unico ceppo di *E. coli* positivo per entrambe le classi. Mentre l'integrone di classe 1 presentava nella propria regione variabile un unico gene (*aadA1*), l'integrone di classe 2 conteneva la stessa cassetta genica affiancata però ad una porzione di circa 100 bp del gene *sat2*. La presenza di un gene incompleto può essere interpretata come possibile conseguenza di un errato riarrangiamento durante l'acquisizione o la perdita di cassette geniche nel sito di ricombinazione.

CONCLUSIONI

E' noto che negli ultimi decenni si è assistito a un rapido incremento del fenomeno dell'antibiotico-resistenza sia in batteri commensali sia patogeni. La selezione e la diffusione di popolazioni batteriche antibiotico-resistenti negli animali, nell'ambiente e nell'uomo rappresentano un grave problema di sanità pubblica.

La Comunità Europea, infatti, considera l'antibiotico-resistenza alla stregua di una zoonosi e la Direttiva 2003/99/CE obbliga i Paesi membri dell'Unione Europea a dotarsi di un sistema per il suo monitoraggio nelle produzioni animali (Dir. 99/2003/CE e D.L. 191/2006). Questo studio vuole quindi essere un contributo all'approfondimento delle conoscenze sull'argomento, soprattutto in merito alla relazione tra la presenza di integroni e profili fenotipici di multifarmaco-resistenza in ceppi APEC isolati da allevamenti avicoli intensivi. Tali strutture geniche, infatti, soprattutto se localizzate in elementi mobili, quali plasmidi e trasposoni, possono essere responsabili dell'accumulo di resistenze mediante il loro trasferimento orizzontale tra specie batteriche. Pur non giustificando da un punto di vista genetico le resistenze rilevate fenotipicamente ad alcune classi di antibiotici (tetracicline, penicilline, fluorochinoloni e cloramfenicolo) il riscontro di integroni in una percentuale elevata di ceppi con profili di multi-resistenza agli antibiotici rende tali strutture dei marcatori utili per stimare la diffusione del fenomeno della resistenza agli antibiotici negli animali, nell'ambiente e nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. AFSAA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. pp. 214. 2006.
2. AAVV. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition. M2-A9 Vol.26 No. 1 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.
3. Bailey, J.K., Pinyon, J.L., Anantham, S., Hall, R.M. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. J Med Microbiol. 59, 1331-9. 2010.
4. Barnes, H.J., Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P. Colibacillosis. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. (Eds.), Diseases of Poultry, Iowa State Press, Ames, pp.691-737. 2008.

5. Blanco, J., Blanco, M. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino. Servicio de Publicaciones Diputatio, Provincial San Marcos ed., Lugo, Spagna. 2009.
6. Carattoli, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 32, 243-259. 2001.
7. Carattoli, A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 113-122. 2003.
8. da Costa, P.M., Bica, A., Vaz Pires, P., Bernardo, F. Effects of anti-microbial treatment on selection of resistant *Escherichia coli* in broiler fecal flora. *Microb. Drug Resist.* 14,299–306. 2008.
9. da Costa, P.M., Belo, A., Goncalves, J., Bernardo, F. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. *Vet. Microbiol.* 139,284–292. 2009.
10. Dawes, F.E., Kuzevski, A., Bettelheim, K.A., Hornitzky, M.A., Djordjevic, S.P. Distribution of Class 1 Integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-Conserved Segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *PLoS ONE* 5(9):e12754. doi:10.1371/journal.pone.0012754. 2010.
11. Decreto Legge 4 aprile 2006, n. 191. Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici. *Gazz. Uff. n. 119 del 24 maggio 2006.*
12. Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003. sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, 12.12.2003.
13. Ekkapobyotin, C., Padungtod, P., Chuanchuen, R. Antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolates from swine. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 325-8. 2008.
14. Gyles, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health Res. Rev.* 9, 149-158. 2008.
15. Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185-191. 1995.
16. Literak, I., Dolejska, M., Rybarikova, J., Cizek, A., Strejckova, P., Vyskocilova, M., Friedman, M., Klimes, J. *Microbial Drug Resistance.* 15(3): 229-237. doi:10.1089/mdr.2009.0913. 2009.
17. Maguire, A.J., Brown, D.F.J., Gray, B.J., Desselberger, U. Rapid Screening Technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting Gram-negative bacteria and its use in molecular biology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1022-1029. 2001.
18. Ozaki,H.,et al. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.020. 2010.
19. Partridge, S. Correctly identifying the streptothricin resistance gene cassette. *J. Clin. Microbiol.* 43(8): 4298–4300. 2005.

20. Soufi, L., Abbassi, M.S., Saenz, Y., Vinuè, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(9):1067-73. 2009.
21. Smith, J.L., Drum, D.J., Dai, Y., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., Hofacre, C.L., Lee, M.D. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,1404–1414. 2007.
22. Unno, T., Han, D., Jang, J., Lee, S.N., Kim, J.H., Ko, G., Kim, B.G., Ahn, J.H., Kanaly, R.A., Sadowsky, M.J., Hur, H.G. High diversity and abundance of antibiotic-resistance *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam Province, South Korea. *Sci Tot. Env.*, 408, 3499-3506. 2010.
23. Van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C., Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 48(4):587-8. 2001
24. White, P. A., C. J. McIver, Rawlinson R.W. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2658–2661. 2001.
25. Wilkerson, C., Samadpour, M., van Kirk, N., Roberts, M.C. Antibiotic Resistance and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Humans and Bovines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 3:1066–1067. 2004.
26. Zanella, A., Alborali, G.L., Bardotti, M., Candotti, P., Guadagnini, P.F., Moreno, A., Stonfer, M. Severe *Escherichia coli* O111 septicemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian Pathology*, 29, 311-317. 2000.

Tabella 1. Esito della valutazione dell'antibiotico-sensibilità nei diversi cicli produttivi.

	Sensibile			Resistente		
	1° ciclo	2° ciclo	3° ciclo	1° ciclo	2° ciclo	3° ciclo
Aminosidina	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Apramicina	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Gentamicina	100%	96%	100%	0%	4%	0%
Enrofloxacin	20%	7%	0%	80%	93%	100%
Amoxicillina	20%	0%	0%	80%	100%	100%
Ampicillina	20%	0%	0%	80%	100%	100%
Trimethoprim+ Sulfametossazolo	90%	57%	0%	10%	43%	100%
Colistina	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Ossitetraciclina	0%	0%	0%	100%	100%	100%

Tabella 2. Esito della valutazione dell'antibiotico-sensibilità nell'ambito dei diversi sierotipi.

	Sensibile				Resistente			
	O78	O2	O111*	NT	O78	O2	O111*	NT
Aminosidina	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Apramicina	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Gentamicina	96%	100%	100%	100%	4%	0%	0%	0%
Enrofloxacin	0%	21%	0%	20%	100%	79%	100%	80%
Amoxicillina	0%	7%	100%	0%	100%	93%	0%	100%
Ampicillina	0%	7%	100%	0%	100%	93%	0%	100%
Trimethoprim+ Sulfametossazolo	75%	21%	100%	0%	25%	79%	0%	100%
Colistina	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Ossitetraciclina	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%

NT = ceppi non tipizzati

*Era presente un solo ceppo del sierotipo O111

Tabella 3. *Pattern* fenotipico e genotipico di resistenza agli antibiotici dei ceppi di *E. coli* indagati in questo studio. Di ciascun ceppo sono elencati anche il numero di identificazione dell'animale da cui è stato isolato ed il ciclo di allevamento in cui quest'ultimo era inserito, la sede anatomica da cui è stato isolato il ceppo ed il suo sierotipo.

Animale	Ciclo produttivo	Sierotipo	Lattosio	Organo	Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza		Presenza di integroni		Cassette geniche di antibiotico-resistenza	PM (pb)
					di antibiotico-resistenza	di antibiotico-resistenza	cl. 1	cl. 2		
13432-1	1	O78	-	cervello	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, CAT	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, CAT	-	-		
14359-1	1	O78	-	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT	AML, AMP, ENR, OT	-	-		
14964-1	1	O78	-	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
17421-1	1	O2	-	cervello	OT, SSS	OT, SSS	-	-		
18041-1	1	NT	-	fegato	AML, AMP, SXT, OT, SSS, S	AML, AMP, SXT, OT, SSS, S	-	-		
18456-1	1	O78	-	cervello	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
19038-1	1	O111	+	polmone	ENR, OT, SSS, S	ENR, OT, SSS, S	-	-		
19700-1	1	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT	AML, AMP, ENR, OT	-	-		
20317-1	1	O78	-	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
20318-1	1	O78	-	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
27028-1	2	O2	+	cervello	AML, AMP, OT, S	AML, AMP, OT, S	-	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
27619-2	2	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, CAT	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, CAT	+	-		
27620-1	2	O2	+	cervello	AML, AMP, OT, S	AML, AMP, OT, S	-	-		
28234-1	2	O2	+	liquido pericardico	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, SH, CAT	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, SH, CAT	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
28234-1	2	O2	+	milza	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, SH, CAT	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, SH, CAT	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
29610-1	2	O78	+	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT, S	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
29610-1	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
29610-2	2	O78	-	cervello	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
29611-1	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT	AML, AMP, ENR, OT	-	-		
410-1	2	O78	+	cervello	CN, AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	CN, AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	+	-	<i>estX-aadA1</i>	1800
1037-1	2	O78	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, S	AML, AMP, SXT, ENR, OT, S	-	-		
1037-1	2	O78	+	liquido pericardico	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-		
1037-1	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-		
1037-2	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
1037-2	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
1038-1	2	NT	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
1038-2	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S, CAT	AML, AMP, ENR, OT, S, CAT	-	-		

Animale	Ciclo produttivo	Sierotipo	Lattosio	Organo	Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza	Presenza di integroni		Cassette geniche di antibiotico-resistenza	PM (pb)
						cl. 1	cl. 2		
1038-3	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
1038-4	2	O78	+	polmone	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
2216-1	2	NT	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	+	+	<i>aadA1</i> , <i>sat2-aadA1</i>	1000
2497-1	2	O78	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-		
2759-1	2	O78	+	art. coxofemorale	S, CAT	-	-		
3302-1	2	O78	+	art. coxofemorale	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-		
3302-1	2	O78	+	art. coxofemorale	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-		
3302-1	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
3302-4	2	O78	+	art. coxofemorale	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
3302-4	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, SH	-	-		
3302-4	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT	-	-		
12685-1	3	O2	+	liquido pericardico	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, SH	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
12685-2	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
13282-1	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
14486-1	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
4486-2	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
14486-1	3	NT	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	+	-	-	
14486-2	3	NT	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	+	-	-	
15189-1	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
15189-2	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
15189-3	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000

ENCEFALOMIELITE AVIARE (AE) NEL POLLO DA CARNE E NELLA POLLASTRA OSSERVATI NELL'ANNO 2010

Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Gibelli L., Gelmetti D., Massi P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
"Bruno Ubertini" - Brescia*

Summary

Avian encephalomyelitis (AE) is an infectious viral disease affecting young chickens, pheasants, quail and turkeys. It is characterized by ataxia and rapid tremors, especially of the head and neck "epidemic tremor", drop in egg production and hatching rate in laying hens.

Two cases of avian encephalomyelitis observed in 2010 in the pullet and broiler was described. Severe nervous symptoms were observed at 20 days of age in broilers and between 70-100 days of age in pullets. In both cases, the diagnosis was Avian Encephalomyelitis.

Riassunto

L'Encefalomielite Aviare è una malattia virale che colpisce i polli, i fagiani, le quaglie ed i tacchini. E' caratterizzata da atassia, tremori localizzati soprattutto nella regione della testa e del collo "tremore epidemico", calo dell'ovodeposizione e riduzione del tasso di schiusa nell'ovaiola. Si descrivono due casi di Encefalomielite Aviare osservati nel 2010 nel broiler e nella pollastra. Venivano osservati gravi sintomi nervosi a 20 giorni nei broilers e tra 70 ed i 100 giorni di vita nelle pollastre. In entrambi i casi la diagnosi è stata di Encefalomielite Aviare.

INTRODUZIONE

L'Encefalomielite Aviare (AE) è una malattia virale che colpisce i polli, i fagiani, le quaglie ed i tacchini. E' caratterizzata da atassia, tremori localizzati soprattutto nella regione della testa e del collo "tremore epidemico", calo dell'ovodeposizione e riduzione del tasso di schiusa nell'ovaiola. La malattia è stata segnalata per la prima volta negli anni '30 negli Stati Uniti in pulcini *Rhode Island Red* di due settimane di vita. Segnalata per la prima volta in Europa quindi in Italia nel 1961. L'agente causale dell'AE è un enterovirus appartenente alla famiglia *Picornaviridae*. Non sono state dimostrate differenze sierologiche tra i vari stipiti isolati, mentre si distinguono due patotipi: enterotropo e neurotropo. I ceppi isolati da casi di infezione naturale sono in prevalenza enterotropi ed infettano i pulcini per via oro fecale. Il neurotropismo varia da ceppo a ceppo. Il virus dell'EA replica in uova embrionate di pollo inoculate per via intravitellina ed in colture di cellule neurogliali embrionali, renali e pancreatiche e su fibroblasti di embrioni di pollo.

Il ceppo enterotropo può trasmettersi per via verticale od orizzontale, assume carattere neurotropo nei pulcini, risulta scarsamente patogeno nei soggetti adulti nei quali determina caduta dell'ovodeposizione. Il ceppo neurotropo causa una grave sintomatologia nervosa nel pulcino inoculato per via sperimentale, non risulta patogeno se assunto per via orale in quanto incapace di moltiplicarsi a livello intestinale. Il virus può infettare le uova deposte per circa un mese dalla fase acuta

d'infezione nella gallina. In questo caso si osserva una riduzione del tasso di schiusa e la nascita di pulcini con sintomi nervosi: depressione, tremori della testa e del collo, atassia progressiva fino alla paralisi, a partire già dal primo giorno di vita. La diffusione del virus avviene per via oro-fecale con massima escrezione tra le 2 e le 3 settimane nel corso delle quali anche la sintomatologia raggiunge la sua massima espressione. I sintomi sono tanto più gravi tanto più precoce è l'infezione, per questo l'esposizione al virus dopo la terza settimana di vita non sempre determina la comparsa di sintomatologia apprezzabile. Le galline in deposizione raramente mostrano segni clinici. La mortalità può raggiungere mediamente il 25% fino al 60%, la morbilità è legata allo stato immunitario dei riproduttori. La diagnosi clinica nei soggetti giovani è molto importante e va differenziata da altre malattie come Malattia di Marek, encefaliti purulente, encefaliti micotiche, carenze vitaminiche, stati tossici.

Non sono state descritte lesioni anatomopatologiche patognomoniche, la diagnosi virologica ed istologica sono di fondamentale supporto (1; 2).

Questo lavoro descrive alcuni focolai di EA in tre allevamenti di polli da carne ed in due allevamenti di pollastre, osservati nel corso dell'anno 2010, presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'IZSLER.

MATERIALI E METODI

Dati anamnestici e prelievo dei campioni

Pollo da carne

A maggio 2010, in tre allevamenti di polli da carne ciascuno costituito da circa 40.000 capi, nati tutti dallo stesso gruppo di riproduttori, venivano osservati sintomi neurologici caratterizzati da blandi tremori del capo ed atassia locomotoria nei pulcini a partire dalla prima settimana di vita. Veniva stimata una mortalità del 4%. Le autopsie effettuate in allevamento, mostravano lesioni da colisetticemia, per questo motivo il gruppo veniva trattato con enrofloxacin, amoxicillina e polivitaminici. Il tasso di mortalità imputato alla colisetticemia era decisamente alto e tendeva a crescere fino al 10% a 15gg. Venivano quindi conferiti circa 20 soggetti, di 15 giorni di vita, in parte vivi ed altri morti, presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'IZSLER. Dopo l'osservazione clinica, tutti gli animali venivano sottoposti ad esame autoptico, venivano prelevati: cervello per esame batteriologico, micologico, RT PCR EA; venivano allestiti campioni di encefalo, cuore, ed una sezione di muscolo scheletrico per l'esame istologico.

Pollastra

A metà ottobre 2010, in due allevamenti di pollastre leggere Hyline, entrambi con una consistenza di circa 50.000 capi, venivano osservati sintomi neurologici a partire dai 50 giorni di vita con picco a 70 giorni, persistenza fino ai 95/100 giorni poi, a seguire, una graduale remissione. Conseguiva un notevole calo del consumo di mangime e ridotto accrescimento corporeo. Veniva stimata una morbilità del 1,5% a circa 70 giorni. Difficile stimare correttamente i dati relativi alla mortalità nella fase acuta del problema, questo perchè i soggetti clinici venivano giornalmente individuati e soppressi. Solo l'ultima selezione degli animali al carico, che evidenziava molti soggetti apparentemente ciechi, permetteva di stimare una perdita totale del 6,5%. Venivano conferiti 6 soggetti vivi per allevamento di circa 50 giorni di vita. Dopo l'osservazione clinica, tutti gli animali venivano sottoposti ad esame autoptico,

venivano prelevati: cervello per RT PCR EA. Campioni di encefalo, fegato, milza, stomaco ghiandolare, nervi ischiatici di ciascun gruppo erano fissati in formalina al 10% per la valutazione istologica.

RT-PCR per la ricerca dell'AEV

L'estrazione dell'RNA da omogenato di cervello veniva condotta mediante l'utilizzo del kit commerciale RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Veniva allestita una reazione di RT-PCR che amplifica un frammento di 619bp del gene VP2 del virus dell'Encefalomielite aviaria (Xie et al., 2005) utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®). In particolare, in 25µl totali venivano miscelate le seguenti componenti: 1µM di ogni primer (MK AE 1: 5'-CTTATGCTGGCCCTGATCGT -3', MK AE 2: 5'-TCCCAAATCCACAAACCTAGCC -3'), 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), 35 X (94°C, 1 min; 62°C, 1 min, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 10 min).

Isolamento dell'AEV

Veniva allestito un inoculo su uova embrionate di pollo SPF di 6 giorni d'incubazione mediante iniezione intravitellina a partire da omogenati di cervello. Non venivano eseguiti passaggi ciechi col tentativo di portare i pulcini alla schiusa.

Esame istologico

I campioni sono stati disidratati ed inclusi in paraffina secondo le metodiche in uso, sezioni seriate di 5micron sono state colorate con ematossilina-eosina.

RISULTATI

Pollo da carne

Sintoni clinici

Veniva fatta un'osservazione clinica negli animali vivi che permetteva di confermare la presenza di sintomi nervosi, gli animali mostravano ottundimento del sensorio, tremore del capo, nei casi più gravi decubito laterale con incapacità di movimento ed insensibilità agli stimoli esterni.

Esame anatomopatologico

Il gruppo si presentava gravemente disomogeneo, con disparità di sviluppo scheletrico e muscolare, apparato gastroenterico vuoto, in alcuni soggetti si osservava edema sottocutaneo, non si osservavano altre lesioni di rilievo nei restanti apparati.

Esame batteriologico e micologico

Non veniva dimostrata crescita batterica nè fungina nei campioni di cervello.

RT PCR per la ricerca dell'AEV

L'omogenato di pool di cervelli prelevati in sala autoptica dimostrava la presenza dell' EAV. Anche il cervello prelevato dai pochi embrioni morti prima della schiusa, così come quello prelevato dai soggetti nati dalle uova embrionate, inoculate col campione patologico, dimostravano la presenza dell'AEV con RT PCR.

Isolamento dell'AEV

Non veniva registrata mortalità embrionale significativa, le uova venivano portate alla schiusa al fine di dimostrare la riproduzione sperimentale dell'AE nei soggetti nati. I pulcini schiusi dalle uova inoculate mostravano gravi sintomi nervosi a partire dal quarto-quinto giorno di vita.

Esame istologico

Le lesioni microscopiche in tutti gli animali erano localizzate prevalentemente nell'encefalo. Le prime osservazioni, evidenziavano un encefalite sub acuta, localizzata nelle aree basali e nello strato molecolare del cervelletto. L'infiltrato costituito prevalentemente da linfociti e plasmacellule aveva una disposizione perivasale. Peculiare era l'infiltrazione gliale che circondava le cellule del Purkinije e si estendeva allo strato molecolare del cervelletto con una caratteristica disposizione "a fiamma". Il quadro osservato era suggestivo di encefalite virale. Negli altri organi non si osservavano reperti di rilievo se non blandi segni di flogosi infiammatoria aspecifica.

Pollastra

Sintomi clinici

Veniva fatta un'osservazione clinica negli animali vivi che permetteva di confermare la presenza di sintomi nervosi, gli animali mostravano grave depressione del sensorio, incoordinazione motoria, appoggio sui tarsi ed incapacità di mantenere la stazione, in alcuni casi, decubito laterale con iperestesia degli arti e delle falangi.

Esame anatomopatologico

Negli animali di entrambi gli allevamenti si osservava disparità di sviluppo e forte dimagrimento, apparato gastroenterico vuoto o con scarsa presenza di alimento, assenti altre lesioni visibili macroscopicamente.

RT PCR per la ricerca dell'AEV

Isolamento dell'AEV

Vedi quanto descritto nel caso precedente.

Esame istologico

Anche in questo caso le lesioni microscopiche in tutti gli animali erano localizzate prevalentemente nell'encefalo con lesioni sovrapponibili a quanto descritto per il pollo da carne. Si osservava inoltre una nevrite linfocitaria caratterizzata da manicotti e degenerazione Walleriana delle neurofibrille.

Il quadro osservato era suggestivo di encefalite virale. Negli altri organi non si osservavano reperti di rilievo se non blandi segni di flogosi infiammatoria aspecifica.

CONCLUSIONI

Viene descritto in maniera sintetica quanto svolto al fine di giungere ad una diagnosi eziologica. Gli allevamenti di polli da carne studiati erano tre, accumulati dal gruppo di riproduzione e dal periodo di insorgenza dei sintomi. Non esistevano sostanziali differenze. In tutti si osservava una mortalità del 4% alla prima settimana di vita, con passaggio al 10% a 15 giorni, fino ad un picco del 15% a 20 giorni. I sintomi calavano gradualmente fino al carico delle femmine leggere (35gg). I pesi medi di macellazione delle femmine leggere, femmine medie (48gg) e maschi pesanti (52gg) risultavano nella norma. La spiegazione deriva dal fatto che quotidianamente, nell'allevamento, veniva effettuata una selezione degli animali con eliminazione anche di quelli sintomatici. I pulcini derivavano da riproduttori regolarmente vaccinati con vaccino vivo attenuato AE somministrato in acqua di bevanda, in unico intervento, a 10 settimane di vita.

Non è da escludere che in un momento commerciale in cui vi era una forte richiesta

del “prodotto pulcino”, venivano incubate uova “sottopeso” cioè di riproduttori molto giovani, anticipando la schiusa di almeno tre settimane e conseguente nascita di pulcini con scarsa immunità materna.

Anche nel caso degli allevamenti di pollastre, le indagini di laboratorio conducevano alla diagnosi di Encefalomyelite aviaria in entrambi gli allevamenti indagati. Non si avevano informazioni anamnestiche sul gruppo dei riproduttori e dal momento che la malattia si manifestava nel gruppo piuttosto tardivamente, si può supporre un’infezione orizzontale in soggetti con scarsa immunità materna, quindi scarso booster anticorpale protettivo o con ridotta capacità immunitaria di tipo attivo. Le pollastre venivano vendute sottopeso ad un unico allevamento di galline ovaiole, veniva segnalato un ritardo di entrata in deposizione del gruppo il quale, una volta raggiunto il peso fisiologico, manteneva una regolare curva di deposizione per tutto il ciclo produttivo.

Da diversi anni non si osservava questa patologia, la peculiarità di tutti i casi osservati sta nella comparsa di sintomi tardivi, bassa mortalità e morbilità rispetto a quanto normalmente viene descritto per questa patologia. L’approccio diagnostico in tutti i casi era simile, variava nei dati anamnestici e nella diagnosi differenziale, nessuna sostanziale differenza nella parte relativa alla ricerca del virus, all’isolamento ed alla diagnosi istologica.

BIBLIOGRAFIA

1. Calnek B. (2008) Avian Encephalomyelitis in Saif Y.M., Barnes H.J., Glissen J.R., Fadly A M., McDougall L.R. and Swaine D.E. Disease of poultry, XII ed Iowa State University Press
2. Tannock G.A. and Shafren D.R. (1994) Avian Encephalomyelitis: a review. Avian Pathology 23: 603-620.
3. Xie Z. et al. (2005) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction to Detect Avian Encephalomyelitis Virus. Avian Diseases 49: 227-230.

MONITORAGGIO LONGITUDINALE PER IL RILIEVO DI *CAMPYLOBACTER* TERMOFILILI IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI DA CARNE

Giacomelli M.¹, Andrighetto C.², Lombardi A.², Martini M.¹, Piccirillo A.¹

¹*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (Padova).*

²*Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Veneto Agricoltura, Via San Gaetano, 74 - 36016 Thiene (Vicenza).*

Summary

Longitudinal studies were conducted in commercial meat turkey farms in order to investigate on the occurrence of thermophilic *Campylobacter* species and to evaluate the trend of infection during the entire production cycle (i.e. from day-old chicks up to slaughter time). Furthermore, *Campylobacter* species distribution analysis and genetic characterization of isolates were carried out, and their antimicrobial susceptibility profile was determined. Three flocks belonging to three different intensive farms located in the province of Vicenza, Veneto region, were examined. Samples were regularly collected at weekly intervals up to *Campylobacter* colonization of the flocks, then twice a month up to time of slaughter. A conventional culture method and a multiplex end-point PCR assay were used for *Campylobacter* detection and identification, respectively. Selected isolates were genetically characterized by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR and by *flaA* short variable region (SVR) DNA sequencing. Antimicrobial susceptibility testing of isolates was performed by disk diffusion method. A high occurrence of thermophilic *Campylobacter* infection was detected, with colonization of birds persisting throughout the whole production cycle. Both *C. jejuni* and *C. coli* were recovered and a high genetic diversity was observed among them. Moreover, antimicrobial-resistance appeared to be widely spread among turkey campylobacters.

INTRODUZIONE

Le specie termofile di *Campylobacter* sono tra i principali responsabili di gastroenterite batterica umana in tutto il mondo e la causa della zoonosi più frequentemente riportata nell'Unione Europea (EFSA, 2010a). Inoltre, è sempre più frequente, e di conseguenza preoccupante, l'isolamento dagli animali, dagli alimenti e dall'uomo, di ceppi di *Campylobacter* resistenti nei confronti di numerosi antimicrobici, tra cui quelli di prima scelta nella terapia dell'infezione umana. Tutto ciò fa della campilobatteriosi un problema di Sanità Pubblica attuale e di notevole rilevanza.

Il *reservoir* del microrganismo è rappresentato dal tratto gastroenterico di numerosi mammiferi e uccelli domestici e selvatici, ma soprattutto dei volatili da reddito. Infatti, la principale fonte di infezione per l'uomo è costituita dal consumo di carne avicola poco cotta o di prodotti contaminati da questa. Nonostante sia stato dimostrato ormai da tempo l'importante ruolo svolto dalla carne di tacchino nella trasmissione dell'infezione all'uomo (Rosef *et al.*, 1984), la maggior parte dei dati

relativi alla diffusione di *Campylobacter* spp. negli avicoli da reddito è relativa ai polli da carne, mentre nei tacchini sono stati svolti pochissimi studi a riguardo. Pertanto, mentre si conosce bene l'epidemiologia di *Campylobacter* spp. nei broiler, molto rimane ancora da chiarire riguardo l'infezione nei tacchini da carne.

Date le scarse informazioni disponibili circa le dinamiche epidemiologiche del principale agente di zoonosi trasmessa per via alimentare in questa specie avicola allevata intensivamente per il consumo umano, il presente studio è stato intrapreso con molteplici scopi. Si è voluto indagare sulla presenza di *Campylobacter* termofili in allevamenti intensivi di tacchini da carne del Veneto, analizzare l'andamento dell'infezione durante l'intero ciclo produttivo (a partire dall'accasamento fino al momento del carico per la macellazione), valutare la distribuzione di specie dei microrganismi, caratterizzarli a livello genetico per osservarne la biodiversità, ed infine rilevare la sensibilità agli antimicrobici degli isolati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Tra settembre 2009 e maggio 2010 sono stati monitorati tre gruppi di tacchini da carne, due di femmine ed uno di maschi, provenienti da tre differenti allevamenti intensivi siti in Veneto, nella provincia di Vicenza. Le principali caratteristiche dei gruppi e degli allevamenti di provenienza sono riportate nella Tabella 1. In ciascun gruppo sono stati eseguiti campionamenti settimanali dalla schiusa fino alla positivizzazione, e successivamente a cadenza quindicinale fino al giorno del carico per la macellazione. Il primo campionamento è avvenuto all'incubatoio, dove è stato prelevato il meconio di 60 pulcini, mentre nei campionamenti successivi, svolti in allevamento, è stato eseguito un tampone cloacale a 60 soggetti scelti casualmente. Sia i campioni di meconio che i tamponi, questi ultimi collocati in terreno di trasporto Amies con carbone (Copan, Brescia, Italia), venivano conservati in borsa termica fino all'arrivo al laboratorio, dove pervenivano entro una-due ore dal prelievo, per poi essere processati immediatamente.

Isolamento e identificazione

L'isolamento di *Campylobacter* termofili dal meconio e dai tamponi cloacali è avvenuto secondo le linee guida della *World Organization for Animal Health* (OIE, 2008). I campioni, processati a *pool* di tre, sono stati inizialmente inoculati nel brodo di arricchimento selettivo Preston (OXOID, Basingstoke, UK) e incubati a 41,5 C in condizioni di microaerofilia, ottenuta in giare per anaerobiosi mediante i generatori CampyGen® (OXOID). Dopo 24 ore di incubazione, un'aliquota (150 µl) di ciascuna brodocoltura è stata seminata su Karmali agar (OXOID), previa filtrazione attraverso membrane sterili (Whatman, Maidstone, UK) con pori del diametro di 0,45 µm. Le piastre sono state incubate per 48 ore a 41,5 C in microaerofilia e quindi esaminate alla ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. Da ciascuna piastra positiva è stata prelevata una colonia da sottoporre ad identificazione di genere e di specie. Questa è stata eseguita mediante *end-point multiplex* PCR, secondo il protocollo descritto da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007), utilizzando *primer* specifici per *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, oltre ad una coppia di *primer* avente come target una sequenza del 16S rRNA comune a tutte le specie di *Campylobacter*. Il DNA è stato estratto mediante bollitura per 20 minuti

di un'ansata di patina batterica stemperata in 500 µl di acqua distillata sterile. Per la miscela di reazione, la concentrazione dei *primer* e la quantità di DNA analizzato ci si è attenuti a quanto indicato da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007). Come controllo positivo sono stati utilizzati i seguenti ceppi di referenza: *C. jejuni* ATCC 33291, *C. coli* CIP 70.80, *C. lari* CIP 102722 e *C. upsaliensis* CIP 103681.

Tipizzazione molecolare

Una parte degli isolati (62) è stata analizzata mediante *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)-PCR, allo scopo di caratterizzare i ceppi a livello genetico e di investigarne la biodiversità. Il saggio è stato condotto utilizzando i *primer* M13 (Huey & Hall, 1989) e AP4 (Barbier *et al.*, 1996), selezionati tra cinque diversi *primer* in quanto avevano prodotto il bandeggio più discriminante dopo amplificazione di ceppi di riferimento. Sono state seguite le condizioni di amplificazione e di successiva corsa elettroforetica descritte da Andrighetto *et al.* (2001). I profili di amplificazione ottenuti sono stati elaborati utilizzando il software GelCompar versione 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgio), mentre il *clustering* dei profili RAPD è stato ottenuto mediante il *Pearson product correlation coefficient* e l'*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA).

Gli stessi isolati sono stati successivamente sottoposti ad analisi di sequenza di una regione altamente polimorfa (*short variable region* - SVR) del gene *flaA*, codificante per la flagellina. Il frammento del gene *flaA* contenente la *short variable region* è stato amplificato mediante il protocollo di PCR descritto da Levesque *et al.* (2008) e successivamente sottoposto a sequenziamento. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate utilizzando il software MEGA 4.0 e il metodo di *clustering Neighbor-Joining*. Le sequenze sono state inoltre confrontate con quelle presenti nel database *flaA*-SVR della Oxford University (<http://pubmlst.org/campylobacter>), al fine di determinare le varianti alleliche (genotipi) e le corrispondenti varianti peptidiche da esse codificate.

Il potere discriminante di entrambe le metodiche di tipizzazione molecolare è stato espresso mediante l'indice di diversità di Simpson $D = 1 - \sum n(n-1)/N(N-1)$, dove n =numero di isolati con lo stesso profilo RAPD-PCR o stessa sequenza nucleotidica *flaA*, e N =numero totale di isolati (Hunter, 1990). L'indice D è compreso tra 0 (bassa discriminazione) e 1 (elevata discriminazione).

Valutazione della sensibilità agli antimicrobici

Una percentuale significativa dei ceppi isolati in ciascun gruppo di tacchini è stata sottoposta ad antibiogramma mediante il metodo di diffusione in piastra di Kirby-Bauer (1966). I ceppi, sospesi in soluzione fisiologica sterile (con una torbidità corrispondente allo 0,5 della scala di McFarland), sono stati inoculati in piastre di Mueller-Hinton agar (OXOID) addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone (OXOID), quindi incubate a 37 C per 48 ore in microaerofilia. Nell'esecuzione dei test è stato incluso il ceppo *C. jejuni* ATCC 33560 come controllo positivo.

È stata valutata la sensibilità degli isolati nei confronti di 20 molecole appartenenti a 9 classi di antimicrobici, che includono quelli raccomandati dall'*European Food Safety Authority* (EFSA, 2007) relativamente a *C. coli* e *C. jejuni* e quelli maggiormente impiegati nella terapia dell'infezione umana e in avicoltura. Gli antimicrobici testati sono riportati nell'elenco seguente:

- Aminoglicosidi: apramicina 15 µg (OXOID), gentamicina 10 µg(OXOID), streptomina 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+trimetoprim 25 µg (OXOID);
- Tetracicline: ossitetraciclina 30 µg (OXOID);
- Fenicoli: cloramfenicolo 30 µg (OXOID).

Il cloramfenicolo è stato incluso nel *panel* benché la sua somministrazione agli animali da macello sia vietata in Europa dal 1994, proprio per valutare la sensibilità di *Campylobacter* spp. nei confronti di antimicrobici non più utilizzati.

I risultati degli antibiogrammi sono stati interpretati seguendo le indicazioni fornite dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2007) e analizzati statisticamente mediante il test del chi-quadrato (χ^2) e il test esatto di Fisher.

RISULTATI

Isolamento e identificazione

Microrganismi appartenenti al genere *Campylobacter* sono stati isolati in tutti e tre i gruppi esaminati. Il gruppo A è risultato positivo al campionamento effettuato al 14° giorno di età degli animali, mentre negli altri due gruppi (B e C) il primo riscontro di *Campylobacter* spp. è avvenuto al campionamento effettuato al 91° giorno d'età degli animali. Fin dal primo isolamento, in tutti e tre i gruppi la maggior parte dei *pool* era positiva (gruppo A: 85%; gruppo B: 85%; gruppo C: 90%), con un andamento che si è mantenuto pressoché costante fino alla fine del ciclo produttivo. Gli isolati sono stati identificati come *C. jejuni* e *C. coli*, con entrambe le specie presenti nei gruppi A e B, e la presenza esclusiva di *C. jejuni* nel gruppo C. Inoltre, nel gruppo A è stata rilevata la predominanza di *C. coli* all'inizio (14 gg.) e alla fine del ciclo produttivo (56, 70, 82 gg.), mentre nel gruppo B questa specie è comparsa solo nell'ultimo campionamento (133 gg.) e con un numero di isolati molto limitato. I risultati dell'isolamento e dell'identificazione di specie sono riportati in dettaglio nella Tabella 2.

Tipizzazione molecolare

Dei 62 ceppi isolati dagli animali vivi e sottoposti a caratterizzazione molecolare, 32 provenivano dal gruppo A, 20 dal gruppo B e 10 dal gruppo C. La selezione degli isolati è stata fatta in modo da analizzare da 4 a 5 ceppi per campionamento positivo in ciascun gruppo.

Dall'elaborazione dei profili RAPD-PCR ottenuti è risultato il dendrogramma riportato in Figura 1. Con un livello di similarità del 50%, scelto arbitrariamente per definire le specie, sono stati individuati due *cluster* principali, uno dei quali

raggruppa gli isolati identificati come *C. jejuni*, mentre l'altro raggruppa gli isolati di *C. coli*. Poiché il valore di riproducibilità della RAPD-PCR (ottenuto mediante ripetizione dell'analisi su ceppi di riferimento) è risultato pari all'87%, gli isolati con un livello di similarità inferiore all'87% sono stati considerati differenti. Complessivamente sono stati ottenuti 9 profili di amplificazione (indice di diversità $D=0,83$): 7 nell'ambito degli isolati di *C. jejuni* e 2 nell'ambito di *C. coli*. Considerando separatamente i ceppi isolati in ciascun gruppo di tacchini, nel gruppo A sono stati rilevati 7 diversi profili RAPD-PCR (tra 32 ceppi isolati in 7 momenti diversi del ciclo produttivo), mentre sia nel gruppo B (tra 20 ceppi isolati in 4 campionamenti) che nel gruppo C (tra 10 ceppi isolati in 2 campionamenti) ne sono stati rilevati 3.

L'analisi di sequenza della *short variable region* (SVR) del gene *flaA* ha rilevato una differenza genetica tra gli isolati maggiore rispetto a quella rilevata mediante RAPD-PCR (indice di diversità $D=0,92$). Dal confronto delle sequenze nucleotidiche (476 nucleotidi) è stato ottenuto il dendrogramma riportato nella Figura 2, dove si osservano 14 diversi profili tra i ceppi analizzati. A differenza di quanto riscontrato tramite RAPD-PCR, gli isolati appartenenti alla stessa specie non sempre rientrano nello stesso *cluster flaA* (in figura 2 i *cluster* nei quali sono presenti sia *C. jejuni* che *C. coli* sono affiancati da una linea verticale). Nel gruppo A, dove sono stati identificati 8 diversi profili *flaA*, solo uno è persistito durante la gran parte del ciclo produttivo, mentre nei gruppi B e C non è stato riscontrato alcun genotipo conservato. La comparazione delle sequenze ottenute con quelle presenti nel database *flaA*-SVR della Oxford University (costruito su una regione di 321 nucleotidi) ha permesso di rilevare la presenza di 13 varianti alleliche (14, 16, 17, 21, 23, 34, 67, 260, 287, 597, 717, 770, 1124), con una maggiore frequenza dei genotipi 14 e 260. Le sequenze di tre genotipi (597, 717, 770) presentavano un'identità del 99,7% con quelle presenti nel database *flaA*, pertanto potrebbero essere delle nuove varianti. I 13 genotipi identificati codificavano per 8 peptidi diversi (1, 2, 5, 8, 10, 11, 12, 220), con la predominanza dei tipi 1, 11 e 8.

Valutazione della sensibilità agli antimicrobici

Sono stati sottoposti ad antibiogramma 54 isolati: 30 del gruppo A (15 *C. jejuni* e 15 *C. coli*), 16 del gruppo B (14 *C. jejuni* e 2 *C. coli*) e 8 del gruppo C (tutti *C. jejuni*, essendo l'unica specie isolata in questo gruppo). La prevalenza della sensibilità e della resistenza da parte dei ceppi esaminati è riportata nella Tabella 3.

Dall'analisi è emersa una notevole resistenza ai fluorochinoloni in tutti i gruppi (dall'83% al 90% dei ceppi resistenti nel gruppo A, dal 63% all'87,5% nel gruppo B, 100% nel gruppo C), mentre sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative ($p<0,05$) tra i gruppi nella sensibilità all'acido nalidixico. Infatti, nel gruppo A il 90% dei ceppi era resistente, mentre nei gruppi B e C una metà dei ceppi era sensibile, l'altra metà resistente. La resistenza è prevalsa anche nei confronti dell'associazione sulfametossazolo+trimethoprim (97% dei ceppi resistenti nel gruppo A, 87,5% nel gruppo B, 100% nel gruppo C) e dell'ossitetraciclina (93% dei ceppi resistenti nel gruppo A, 62,5% nel gruppo B, 100% nel gruppo C). Al contrario, il 100% degli isolati era sensibile al cloramfenicolo, e una spiccata sensibilità è stata riscontrata anche nei confronti degli aminoglicosidi (dal 97% al 100% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C), della clindamicina

(80% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C) e dei macrolidi (83% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C). Per quanto riguarda gli antibiotici beta-lattamici, la maggior parte degli isolati testati è risultata resistente all'ampicillina (93% dei ceppi resistenti nel gruppo A, 75% nel gruppo B, 100% nel gruppo C), e la totalità dei ceppi era resistente a cefalotina, ceftiofur e cefuroxime. La resistenza è prevalsa anche nei confronti del cefotaxime nel gruppo A (73% dei ceppi resistenti) e nel gruppo C (87,5% dei ceppi resistenti), mentre nel gruppo B gli isolati testati hanno mostrato un profilo differente nei confronti di questa molecola: il 50% era sensibile, il 31% intermedio e il 19% resistente. Tuttavia tale differenza tra i gruppi di tacchini nella sensibilità al cefotaxime non si è rivelata statisticamente significativa ($p>0,05$). Infine, una sensibilità elevata è stata riscontrata anche nei confronti dell'associazione amoxicillina+acido clavulanico (86,6% dei ceppi sensibili nel gruppo A, 100% nei gruppi B e C).

Il profilo di sensibilità agli antimicrobici dei ceppi di *C. jejuni* è risultato simile a quello di *C. coli*. Inoltre, è stata riscontrata multi-resistenza in tutti gli isolati: nei confronti di un minimo di 4 fino ad un massimo di 15 antimicrobici in *C. jejuni* (da 7 a 15 nel gruppo A, da 4 a 11 nel gruppo B, da 10 a 11 nel gruppo C), nei confronti di un minimo di 3 fino ad un massimo di 15 antimicrobici in *C. coli* (da 3 a 15 nel gruppo A; 7 nel gruppo B).

DISCUSSIONE

Il monitoraggio ha rilevato una notevole diffusione dell'infezione da *Campylobacter* termofili nei tacchini da carne, con positività in tutti e tre i gruppi esaminati. L'assenza dell'infezione negli animali di un giorno d'età avvalorava l'ipotesi circa l'assenza di trasmissione verticale dell'infezione da *Campylobacter* termofili, come già riportato in studi svolti nei broiler (Callicot *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2001). Il fatto che l'infezione si sia instaurata nei gruppi in due momenti notevolmente diversi, molto precocemente (14 giorni di vita degli animali) nel gruppo A e tardivamente (91 giorni) nei gruppi B e C, può essere ricondotto alla diversa stagione nella quale sono state svolte le indagini. Il monitoraggio del primo gruppo è, infatti, iniziato a tarda estate e si è concluso ad autunno del 2009, periodo nel quale le temperature ambientali erano molto miti. Al contrario, i monitoraggi degli altri due gruppi sono iniziati e si sono svolti per la gran parte durante i successivi mesi invernali, particolarmente rigidi, e gli animali hanno positivizzato solo quando le temperature ambientali sono aumentate (alla fine di aprile 2010). L'influenza stagionale sulla contaminazione da *Campylobacter* spp., dipendente dalla temperatura ambientale, è stata rilevata anche in numerosi studi svolti in allevamenti di broiler, nei quali è stato osservato un picco dell'infezione nei mesi estivi (EFSA, 2010b). Pur non essendoci riscontri di questo tipo riguardanti i tacchini, dagli studi svolti fino ad oggi in questa specie avicola è emersa una notevole variabilità nell'età di positivizzazione degli animali. Ci sono segnalazioni di positivizzazione durante la prima settimana del ciclo produttivo (Wallace *et al.*, 1998), ma anche durante la seconda (Scupham, 2009), la terza (Kiess *et al.*, 2007; Scupham, 2009), ed anche tra la quarta e la nona e tra la nona e la diciottesima settimana (Thorsness *et al.*, 2008).

Il rilievo di un'elevata percentuale di campioni positivi fin dal primo instaurarsi dell'infezione, che è persistita durante tutto il ciclo produttivo in tutti i gruppi, dimostra la rapida diffusione di *Campylobacter* spp. tra gli animali una volta

entrato nel gruppo, che è favorita dall'elevata densità di animali presenti in ciascun capannone. Una così notevole prevalenza dell'infezione da *Campylobacter* nei tacchini è stata talvolta associata ad un'aumentata incidenza di disturbi enterici negli animali (Wallace *et al.*, 1998), mentre nel corso di questi monitoraggi non sono stati osservati segni di diarrea nei gruppi. Inoltre non sono state riscontrate differenze nella prevalenza dell'infezione in relazione al sesso degli animali, contrariamente a quanto osservato da Keiss (2001), che aveva invece rilevato una maggiore positività a *Campylobacter* termofili nei tacchini maschi.

Le differenze nella prevalenza di *C. jejuni* e *C. coli* nei gruppi, così come la presenza esclusiva di *C. jejuni* nel gruppo B, confermano le notevoli differenze nella distribuzione delle due specie batteriche all'interno degli allevamenti e dei singoli gruppi di animali (Lee *et al.*, 2005). Inoltre, un'alternanza nella dominanza dell'una o dell'altra specie durante lo stesso ciclo produttivo, così come il prevalere di *C. coli* all'esordio dell'infezione, rilevato nel gruppo A, sono state osservate anche da Scupham (2009).

Dalla caratterizzazione molecolare degli isolati è emersa una notevole biodiversità sia tra i gruppi, sia all'interno di ciascuno di essi. In tutti i gruppi è stata osservata la scomparsa di alcuni genotipi e la comparsa di nuovi con il progredire del ciclo produttivo. Solo in un gruppo (A) un genotipo è persistito per la gran parte del ciclo. Il cambiamento della popolazione di *Campylobacter* durante il ciclo produttivo, con la comparsa di nuovi genotipi e la scomparsa dei precedenti, è stato osservato anche da Wallace *et al.* (1998) durante il monitoraggio di due gruppi di tacchini. L'analisi mediante RAPD-PCR ha rilevato una maggiore biodiversità tra gli isolati di *C. jejuni* rispetto a quelli di *C. coli*, coerentemente con quanto già emerso da studi nei quali sono stati esaminati ceppi isolati da diverse specie animali e dall'uomo, che hanno rilevato una maggiore diversità genetica negli isolati di *C. jejuni* rispetto a quelli di *C. coli* (Aquino *et al.*, 2010; Zorman *et al.*, 2006). Anche la predominanza del peptide di tipo 1, tra quelli codificati dalle varianti alleliche identificate mediante analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA*, ha un riscontro in letteratura. Esso era, infatti, il peptide più frequentemente rilevato in uno studio nel quale erano stati esaminati ceppi di origine umana e avicola (Wassenaar *et al.*, 2008).

Dal confronto tra RAPD-PCR e analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA*, è emersa una maggiore capacità discriminante della seconda metodica (D=0,83 per RAPD-PCR; D=0,92 per sequenziamento SVR-*flaA*). Ciò si spiega con il fatto che la RAPD-PCR ha come *target* l'intero genoma, mentre nell'analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA* si esamina una porzione di un singolo gene. La RAPD-PCR appare comunque una metodica adatta per rilevare la biodiversità tra gli isolati, ma al fine di ottenere informazioni sulla clonalità degli stessi è più adeguata l'analisi di sequenza della *short variable region* del gene *flaA*. Complessivamente, l'uso combinato di queste due metodiche si è dimostrato uno strumento valido, e allo stesso tempo pratico e relativamente economico, per tipizzare isolati di *Campylobacter* spp.

I test di sensibilità agli antimicrobici hanno messo in luce una notevole multi-resistenza, con tutti gli isolati resistenti ad almeno tre molecole. Inoltre, la maggior parte di essi era resistente alla gran parte degli antimicrobici testati, tra i quali alcuni tra i più utilizzati nella terapia della campilobatteriosi umana: i fluorochinoloni, farmaci di prima scelta, e le tetracicline, di seconda scelta. Questo dato è piuttosto allarmante se si considera

che questi microrganismi antibiotico-resistenti sono stati isolati da animali destinati al consumo umano e che la trasmissione di *Campylobacter* spp. dalle specie *reservoir* all'uomo avviene per via alimentare. È stata inoltre rilevata una notevole resistenza all'ampicillina e alle cefalosporine, che tuttavia non desta sorpresa, in quanto è noto che la maggior parte dei ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* è intrinsecamente resistente alle betalattamine (Aarestrup *et al.*, 2008). Al contrario, il rilievo di una notevole sensibilità ai macrolidi è un dato piuttosto inatteso, considerando le numerose evidenze in base alle quali è stato ipotizzato che i ceppi di *Campylobacter* spp. albergati dai tacchini siano più frequentemente resistenti ai macrolidi e ai fluorochinoloni rispetto a quelli che colonizzano i broiler (Ge *et al.*, 2003; Luangtongkum *et al.*, 2006). Questo dato è confortante, in quanto i macrolidi, come i fluorochinoloni, rappresentano la prima linea di difesa nei confronti delle infezioni umane da *Campylobacter* spp. Per quanto riguarda gli aminoglicosidi, nei confronti dei quali la quasi totalità dei ceppi testati era sensibile, i riscontri relativi alla streptomina sono in contrasto con quanto riportato da altri studi svolti nel tacchino (Gu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2005). Erano, infatti, state rilevate percentuali di resistenza da moderata a elevata, mentre tutti i ceppi testati in questo studio erano sensibili alla streptomina. Complessivamente il profilo di antibiotico-sensibilità si è mantenuto costante durante tutto il ciclo produttivo e non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi di tacchini, così come tra *C. jejuni* e *C. coli*. Quest'ultimo dato è in contrasto con le numerose evidenze circa la maggiore diffusione dell'antibiotico-resistenza (soprattutto nei confronti di alcuni antimicrobici) in *C. coli* rispetto a *C. jejuni* (D'lima *et al.*, 2007; EFSA, 2009).

CONCLUSIONI

Questo studio, l'unico di questo tipo svolto fino ad ora in Italia, ha contribuito ad aumentare le informazioni, ad oggi ancora scarse e frammentarie, sulla diffusione e la sensibilità agli antimicrobici di *Campylobacter* termofili nel tacchino. La necessità di svolgere indagini epidemiologiche a riguardo deriva dal crescente consumo di carne di tacchino e dal rilevante ruolo svolto da questa specie avicola nella trasmissione dell'infezione all'uomo. I dati da noi ottenuti mostrano una notevole diffusione dell'infezione e il persistere della stessa durante tutto il ciclo produttivo, con conseguente macellazione di animali infetti. L'infezione è provocata sia da *C. jejuni* che da *C. coli* (con differenze tra i gruppi), con notevole biodiversità tra le specie ed anche nell'ambito della stessa specie batterica. Anche l'antibiotico-resistenza sembra essere molto diffusa, sia in *C. jejuni* che in *C. coli*, con picchi preoccupanti nei confronti dei fluorochinoloni e delle tetracicline.

Parte dei dati da noi ottenuti è coerente con quanto riportato in letteratura, mentre alcuni riscontri contrastano con le conoscenze attuali, come la confortante elevata sensibilità ai macrolidi da noi rilevata. Sicuramente i dati finora disponibili circa la presenza e l'antibiotico-resistenza di *Campylobacter* spp. nei tacchini non sono ancora sufficienti per chiarire le dinamiche epidemiologiche del microrganismo in questa specie avicola. In particolare, sono necessarie ulteriori indagini atte a identificare la fonte d'infezione in allevamento, per comprendere come il patogeno fa il suo ingresso nei gruppi di animali, ed è inoltre necessario approfondire i meccanismi alla base dello sviluppo di antibiotico-resistenza in *C. jejuni* e *C. coli* isolati dai tacchini, obiettivi che costituiscono sviluppi futuri del presente studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Aquino MH, Filgueiras AL, Matos R, Santos KR, Ferreira T, Ferreira MC, Teixeira LM and A Tibana. (2010). Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotypes from human and animal sources from Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 88 (2): 214-217.
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. AAVV. (2008). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *OIE Terrestrial Manual*, Chapter 2.9.3., pp. 1185-1191.
4. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kesters K, Swings J and F Dellaglio (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68: 303-316.
5. Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, Dumontier S and A Andremont. (1996). Random Amplified Polymorphic DNA typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1096-1099.
6. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC and M Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Techn. Bull. Regist. Med. Technol.* 36:493-496.
7. Callicott KA, Friethriksdóttir V, Reiersen J, Lowman R, Bisailon JR, Gunnarsson E, Berndtson E, Hielt KL, Needleman DS and NJ Stern. (2006). Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9): 5794-5798.
8. CLSI (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S17.
9. D'lima CB, Miller WG, Mandrell RE, Wright SL, Siletzky RM, Carver DK and S Kathariou. (2007). Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from Turkeys. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (7): 2156-2164.
10. EFSA (2007). 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.
11. 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.
12. EFSA (2010a). 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.
13. EFSA (2010b). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella*

- on broiler carcasses, in the EU, 2008; Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *The EFSA Journal*. 8 (8): 1522.
14. Ge B, White DG, McDermott PF, Girard W, Zhao S, Hubert S and J Meng. (2003). Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (5): 3005-3007.
 15. Gu W, Siletzky RM, Wright S, Islam M and S Kathariou. (2009). Antimicrobial susceptibility profiles and strain type diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from turkeys in eastern North Carolina. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2): 474-482.
 16. Huey B and J Hall. (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 171: 2528–2532.
 17. Hunter PR. (1990). Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1903-1905.
 18. Keiss A. (2001). *Campylobacter* detection in turkey flocks. M.S. Thesis, West Virginia University, Morgantown.
 19. Kiess AS, Kenney PB and RR Nayak. (2007). *Campylobacter* detection in commercial turkeys. *Br. Poult. Sci.* 48 (5): 567-572.
 20. Lee BC, Reimers N, Barnes HJ, D’Lima C, Carver D and S Kathariou. (2005). Strain persistence and fluctuation of multiple-antibiotic resistant *Campylobacter coli* colonizing turkeys over successive production cycles. *Foodborne Pathog. Dis.* 2 (1): 103-110.
 21. Levesque S, Frost E, Arbeit RD and S. Michaud. (2008). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3404-3411.
 22. Luangtongkum T, Morishita TY, Ison AJ, Huang S, McDermott PF and Q Zhang. (2006). Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (5): 3600-3607.
 23. Petersen L, Nielsen EM and SL On. (2001). Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet. Microbiol.* 82: 141-154.
 24. Rosef O, Gondrosena B and G Kapperuda. (1984). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* as surface contaminants of fresh and frozen poultry carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 1 (4): 205-215.
 25. Scupham AJ. (2009). *Campylobacter* colonization of the turkey intestine in the context of microbial community development. *Appl Environ Microbiol.* 75 (11): 3564-3571.
 26. Thorsness JL, Sherwood JS, Danzeisen GT, Doetkott C and CM Logue. (2008). Baseline *Campylobacter* prevalence at a new turkey production facility in North Dakota. *J. Food. Prot.* 71 (11): 2295-2300.
 27. Wallace JS, Stanley KN and K Jones. (1998). The colonization of turkeys by thermophilic campylobacters. *J. Appl. Microbiol.* 85 (2): 224-230.

28. Wassenaar TM, Fernandez-Astorga A, Alonso R, Marteinson VT, Magnusson SH, Kristoffersen AB and M Hofshagen. (2009). Comparison of *Campylobacter fla*-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 388-395.
29. 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): 1467-1473.
30. Zorman T, Heyndrickx M, Uzunović-Kamberović S and S Smole Mozina. (2006). Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *Int. J. Food. Microbiol.* 110 (1): 24-33.

Tabella 1. Principali informazioni riguardanti i gruppi di animali monitorati.

Gruppi	N° capannoni per allevamento	N° animali per gruppo	Sesso	Data accasamento	Data carico	Durata ciclo (giorni)
A	1	8.000	F	24/09/2010	03/12/2009	82
B	3	3.400	M	20/01/2010	08/06/2010	139
C	2	6.000	F	22/01/2010	11/05/2010	109

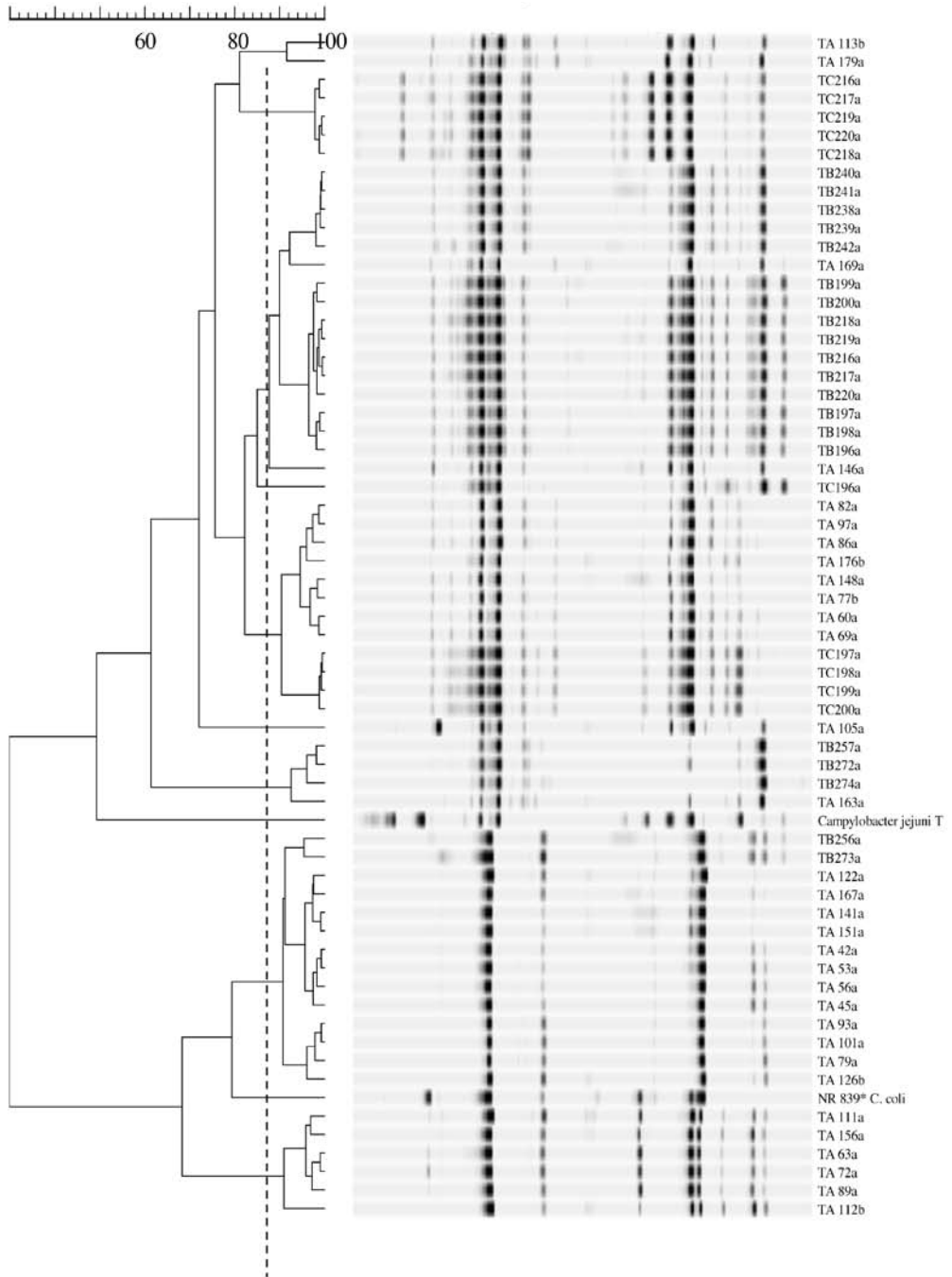
Tabella 2. Risultati dell'isolamento e dell'identificazione di specie degli isolati.

Gruppo	Età animali	Positività	Specie	
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Gruppo A	14 gg.	85%	11,8%	88,2%
	21 gg.	90%	59,1%	40,9%
	28 gg.	90%	56,5%	43,5%
	42 gg.	85%	63,2%	36,8%
	56 gg.	100%	45%	55%
	70 gg.	95%	30%	70%
	82 gg.	75%	47,4%	52,6%
Gruppo B	91 gg.	85%	100%	0%
	105 gg.	100%	100%	0%
	119 gg.	90%	100%	0%
	133 gg.	75%	87%	13%
Gruppo C	91 gg.	90%	100%	0%
	105 gg.	100%	100%	0%

Tabella 3. Risultati dei test di sensibilità agli antimicrobici.

Classe	Principio attivo	Sensibile			Intermedio			Resistente		
		Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
Aminoglicosidi	Apramicina	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Gentamicina	97%	100%	100%	0%	0%	0%	3%	0%	0%
	Streptomycina	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Cefalosporine	Cefalotina	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%
	Cefotaxime	0%	50%	0%	27%	31%	12,5%	73%	19%	87,5%
	Ceftiofur	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%
	Cefuroxime	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%
Penicilline	Ampicillina	7%	25%	0%	0%	0%	0%	93%	75%	100%
	Amoxicillina +Acido clavulanico	86,6%	100%	100%	6,7%	0%	0%	6,7%	0%	0%
Chinoloni	Acido nalidixico	10%	50%	50%	0%	0%	0%	90%	50%	50%
	Flumequina	10%	12,5%	0%	0%	0%	0%	90%	87,5%	100%
	Enrofloxacina	10%	31%	0%	7%	6%	0%	83%	63%	100%
	Ciprofloxacina	10%	12,5%	0%	0%	0%	0%	90%	87,5%	100%
Lincosamidi	Clindamicina	80%	100%	100%	3%	0%	0%	17%	0%	0%
Macrolidi	Eritromicina	83%	100%	100%	0%	0%	0%	17%	0%	0%
	Tilmosina	83%	100%	100%	0%	0%	0%	17%	0%	0%
	Tilosina	83%	100%	100%	0%	0%	0%	17%	0%	0%
Sulfamidici +diaminopirimidine	Sulfametossazolo +Trimethoprim	3%	12,5%	0%	0%	0%	0%	97%	87,5%	100%
Tetraciline	Ossitetraciclina	7%	37,5%	0%	0%	0%	0%	93%	62,5%	100%
Fenicoli	Cloramfenicolo	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Figura 1. Dendrogramma ottenuto dall'elaborazione dei profili RAPD-PCR.



APPROFONDIMENTI DIAGNOSTICI IN ALCUNI CASI CLINICI NELLE SPECIE AVICOLE MINORI

Giovanardi D., Morandini E.

Laboratorio Tre Valli, Gruppo Veronesi, Quinto di Valpantena, Verona

Nel seguente lavoro saranno presi in considerazione alcuni casi clinici diagnosticati in laboratorio e riscontrati nelle cosiddette “specie avicole minori” tra le quali si possono annoverare: anatre, faraone, quaglie, fagiani, pernici, oche, piccioni, struzzi, pavoni, fenicotteri) e volatili ornamentali.

Enterococchi nell’anatra da carne

Questa rara forma morbosa batterica, descritta raramente nelle specie aviari, è attualmente divenuta emergente a causa della comparsa in tutto il mondo, Italia inclusa, di osteomieliti spinali da *Enterococcus cecorum* nel pollo da carne e artriti amiloidi da *Enterococcus faecalis*.

Nelle anatre le infezioni da enterococchi (in passato definiti streptococchi fecali) non sono mai state segnalate, ma recentemente in questa specie animale si sono manifestate con una elevata incidenza.

Tra agosto e settembre 2010, negli allevamenti di anatre da carne era osservata, in una bassa percentuale di animali nelle prime settimane di vita, difficoltà di deambulazione, forme nervose con tremori della testa e mortalità di soggetti in buono stato di nutrizione. Ai primi accertamenti, la sintomatologia clinica poteva essere riferibile ad aspergilloso, infezione da *Riemerella antipestifer* o altri batteri o al virus dell’epatite virale.

Sono stati analizzati 42 soggetti di età compresa da 3 a 42 giorni con una media di 10. La lesione anatomopatologica costantemente ritrovata era epatosplenomegalia (Foto 1). Dall’esame batteriologico sono stati isolati dai visceri (fegato, milza, sacco vitellino) esclusivamente *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus hirae*. La ricerca virologica in microscopia elettronica ha sempre dato esito negativo. Di notevole preoccupazione l’elevata antibiotico-resistenza dei ceppi isolati. In allevamento la terapia effettuata con ampicillina, amoxicillina, enrofloxacinina nell’acqua da bere ha comunque risposto in modo egregio.

L’origine dell’infezione era causata dalla convivenza degli anatrocchi appena nati nello stesso centro di smistamento, prima del trasporto, dove le condizioni igieniche erano scarse e la contaminazione fecale dell’acqua elevata.

***Riemerella antipestifer* nell’anatra e nella faraona**

Nelle due specie animali, questa infezione batterica ha avuto nel 2010 una prevalenza maggiore rispetto agli anni precedenti, come pure nel tacchino in cui è pur sempre maggiormente isolata rispetto a faraone e anatre.

Nelle faraone tre casi si sono riscontrati in animali di età compresa tra 20 e 30 giorni, mentre uno in riproduttori di 37 settimane. La sintomatologia osservata era pressoché analoga in tutti gli episodi con forme nervose rappresentate da tremori della testa. Nelle forme più gravi gli animali venivano trovati sul fianco moribondi con fenomeni di “pedalage” oppure morti.

Peculiare e sempre costante era l'assenza di lesioni anatomopatologiche evidenti se non, come unica presente, la meningite fibrinosa. Indispensabile quindi l'esame di laboratorio per diagnosticare questa forma morbosa.

Nelle anatre questa infezione si era manifestata in due gruppi di animali giovani di 21 giorni di età. Anche se non patognomonicamente, i sintomi clinici che si sono osservati di depressione, scolo nasale, atassia e tremori della testa potevano fare sospettare questa forma nervosa. Peculiare il mancato riscontro di lesioni anatomopatologiche evidenti ai visceri, come già osservato nelle faraone.

Il batterio in tutti i casi menzionati era stato isolato solamente da materiale cerebrale e in assenza di altri batteri. Da rimarcare la sua elevata antibiotico-sensibilità, soprattutto per amoxicillina e ampicillina.

Episodi di colibacillosi nelle faraone e nelle anatre

Le infezioni da *Escherichia coli* in queste specie animali sono piuttosto frequenti, anche se solamente da qualche anno è stata valutata la presenza di ceppi patogeni definiti *Avian Pathogenic E. coli* (APEC). Rispetto a polli e tacchini la prevalenza delle colibacillosi è comunque molto più limitata.

Nelle faraone, come pure *R. anatipestifer*, la colibacillosi aveva colpito animali di età variabile con sette casi in animali da ingrasso e uno nei riproduttori. La maggior parte dei casi era comunque compresa tra 20-30 giorni, probabilmente esacerbata da infezioni concomitanti di *Metapneumovirus* aviare (AMPV) e coccidiosi. Da rimarcare che AMPV non è mai stato isolato da questa specie animale, mentre evidenze sicure della sua presenza sono documentate da siero-conversioni in animali da carne e da riproduttori.

I sintomi clinici non erano patognomonicamente e comprendevano depressione del sensorio, starnuti, anoressia e, nelle fasi avanzate della malattia, si potevano trovare in allevamento soggetti deceduti.

Le lesioni anatomopatologiche sono riferibili per la maggior parte a pericardite e aerosacculite fibrinosa come a indicare un'infezione per via aerogena di *E. coli*. La milza, soprattutto nei casi più acuti appariva aumentata di volume. Nei soggetti riproduttori si notava evidente peritonite fibrinosa.

L'isolamento e la successiva tipizzazione di *E. coli* dai vari visceri quali cervello, fegato e milza erano accompagnati dalla valutazione della sua antibiotico-sensibilità che non presentava particolari resistenze verso i farmaci dedicati ai batteri Gram negativi.

I ceppi isolati sono da considerarsi APEC a tutti gli effetti dato che possedevano alcuni geni di virulenza codificanti per fimbrie, pili, siderofori ed emoagglutinine che favoriscono la sopravvivenza di *E. coli* nel torrente circolatorio e la colonizzazione tracheale e dei sacchi aerei.

Nelle anatre, gli episodi di colibacillosi sono stati estremamente rari e hanno colpito solamente animali all'ingrasso di età compresa tra i 10 e i 24 giorni. Questa forma morbosa è ampiamente descritta nel mondo come setticemia colibacillare delle anatre.

In questa specie, si sono osservate forme respiratorie e nervose con aerosacculiti, pericarditi, periepatiti e peritoniti. A differenza degli episodi da *R. anatipestifer*, dove non si notava alcuna lesione macroscopica, nella colisettemia era presente un essudato più o meno denso, di vario spessore, sulla superficie dei visceri toracici,

addominali e sui sacchi aerei. La milza e il fegato erano aumentati di volume e più scuri, con pigmentazione verde del fegato.

Come nella faraona, l'isolamento e la tipizzazione di *E. coli* dalle lesioni non presentava particolari difficoltà, come pure la valutazione della presenza di geni di virulenza. I ceppi in questione risultavano portatori di alcuni di essi così da essere considerati APEC.

Enterite necrotica nella faraona

Questa malattia, ben conosciuta in animali di altre specie come pollo e tacchino, è estremamente rara nella faraona. A fronte di episodici isolamenti di *C. perfringens* da intestino di animali in assenza di lesioni necrotiche, nel 2010 questa malattia è stata osservata in due casi sempre derivanti dallo stesso allevamento.

I soggetti colpiti avevano rispettivamente 45 e 90 giorni di vita. In allevamento la mortalità improvvisa era la chiara conseguenza di animali da poco tempo depressi, anoressici e diarroici.

Le lesioni macroscopiche erano quantomeno spettacolari e presenti nel tratto medio del piccolo intestino che si presentava gonfio e fragile. Il contenuto intestinale era costituito da liquido brunastro e maleodorante; la mucosa era ricoperta da membrane difteriche. Le carcasse presentavano una grave disidratazione della carcassa, con incurimento dei muscoli pettorali e congestione del fegato.

L'esame batteriologico dell'intestino in anaerobiosi metteva in evidenza coltura pura di *C. perfringens* in entrambi i casi clinici. La sua antibiotico-sensibilità rendeva possibile il trattamento con amoxicillina, ampicillina o tilosina nell'acqua da bere.

Uno dei due ceppi isolati apparteneva al tossinotipo A (presenza di tossina α) β 2 positivo. Una rarità se si considera che altri ceppi di *C. perfringens* isolati da faraona, in assenza di lesioni necrotiche, non possedevano il gene per la tossina β 2. Da valutare comunque il ruolo patogenetico dei coccidi, che anche in questi due casi clinici erano presenti nell'intestino anche se in bassa quantità.

RINGRAZIAMENTI

Per il prezioso lavoro di identificazione dei geni di virulenza di *E. coli*, gli autori ringraziano la dott.ssa Pesente e la dott.ssa Rossi (Laboratorio Tre Valli). Al dott. Bano (IZSVE, sezione di Treviso) va una particolare riconoscenza per l'analisi del tossinotipo dei ceppi di *C. perfringens*.

Foto 1. Epato-splenomegalia da *Enterococcus* nelle anatre.



Foto 2. Enterite necrotica (“*turkish towel*”) nella faraona.



STUDIO DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) IN ALCUNI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ISOLATI IN ITALIA.

Gobbo F., Brustolin M., Battanoli G., Qualtieri K., Bilato D., Iob L., Catania S.,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD), Italy; scatania@izsvenezie.it

Summary

Minimum inhibitory concentrations (MICs) are defined as the lowest concentration of an antimicrobial capable to inhibit the visible growth or metabolism of a microorganism *in vitro* cultivation. Mycoplasma are small prokaryotes without cell wall and their growth result "fastidious" making *in vitro* cultivation very difficult.

Mycoplasma species are important pathogens for poultry industry and particularly *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) can cause severe economic losses.

MS causes respiratory and articular disease with condemnation of carcasses and consequently economic impact. Recently some authors described a particular lesion of the apex of the eggshell correlated to MS infection in the oviducts of layer hens (1, 3).

In Italy the incidence of this pathogen seems to be increased even if the co presence of *Mycoplasma gallisepticum* could underestimated MS spreading.

Nowadays prevention of mycoplasmosis is based mainly on breeding stock PPLO-free (Pleuropneumonia like organisms) and implementation of biosecurity measures to avoid introduction of the microorganism in the farm. Unfortunately these containment procedures have been not successful in prevention of spread of some Mycoplasma infection.

On the contrary biotechnology techniques are able to differentiate accurately between strains through the investigation of the gene *VhLA* encoding the MSP (Most Surface Proteins) (4).

The aim of this study is to gain deeper knowledges of the antimicrobial susceptibility of some strains of MS, isolated in different commercial categories (broiler, hen layer, meat turkey and chicken breeders) in order to provide a useful tool to the poultry industry. Moreover we applied an additional selective parameter to test different MS strains, basing on *VhLA* gene sequence.

Our preliminary results confirmed a good susceptibility for lincosamides, oxytetracycline, and macrolides excluding erythromycin.

INTRODUZIONE

La concentrazione minima inibente più comunemente conosciuta con l'acronimo anglosassone MIC (Minimal inhibitory concentration) è considerata il "gold standard" per la determinazione della suscettibilità dei microrganismi agli antimicrobici tanto da essere utilizzata per confrontare le *performance* di altri metodi diagnostici.

In micoplasmologia la MIC può essere definita come la più bassa concentrazione di una sostanza antibiotica in grado di inibire la crescita visibile o il metabolismo di alcune specie di micoplasmata dopo un ottimale periodo di incubazione *in vitro*.

I micoplasmata sono organismi unicellulari privi di parete cellulare, che possono

causare patologia nel Regno Animale e Vegetale e la loro coltivazione *in vitro* risulta “fastidiosa”..

Nel settore avicolo rivestono un ruolo particolarmente importante il *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ed il *synoviae* (MS). In particolare il *Mycoplasma synoviae* può causare, nel settore da carne, forme respiratorie ed articolari con conseguente incremento degli scarti al macello, mentre nel settore della gallina ovaioia è stato recentemente associato a lesioni apicali del guscio con importanti implicazioni economiche.

L'incidenza nel territorio italiano di MS negli ultimi anni sembrerebbe essere in incremento.

Poiché la via di trasmissione verticale di questi patogeni è stata ampiamente documentata il controllo degli organismi *PPLo-like* (Pleuropneumonia Organism like) nel settore avicolo industriale è basato sulla gestione di gruppi di riproduttori *Mycoplasma-free* e sulla attuazione di rigide misure di biosicurezza.

Nonostante tali precauzioni la prevalenza di questi microrganismi nel settore avicolo industriale non sembra diminuire. Recentemente alcuni Autori hanno proposto di raggruppare i ceppi di MS in base alla sequenza del gene *vlhA*. Tale gene codifica per la proteina MSP (Most Surface Protein), responsabile della citoaderenza e quindi della patogenicità.

Sulla base di tali considerazioni ci siamo proposti di analizzare la MIC di ceppi di *Mycoplasma synoviae*. isolati nel territorio italiano e provenienti da differenti categorie produttive industriali e cercando, ove possibile, di testare ceppi provenienti dalla stessa categoria produttiva e con differenze geniche a carico del gene *vlhA*.

MATERIALI E METODI

I ceppi conservati nella nostra ceppoteca sono stati selezionati attraverso determinati criteri, quali la specie animale, la categoria produttiva di origine ed infine il sequenziamento del gene *vlhA* secondo la metodica pubblicata da (4).

I ceppi selezionati, sono stati rivitalizzati in Experience Medium (privo di sostanze inibenti), ed in seguito clonati. Una volta ottenuto il clone questo è stato sottoposto a prove di crescita per individuare il momento idoneo per l'esecuzione del test, secondo le linee guida per l'esecuzione della MIC dei micoplasmi di interesse veterinario (5).

Le colture, in fase logaritmica, sono state suddivise in sub-aliquote di 2 ml e stoccate a -80 °C previa aggiunta di glicerolo sterile 5%v/v. Una di tali aliquote, dopo scongelamento, è stata utilizzata per la titolazione del ceppo attraverso il metodo delle UCC (Unit Change Colour). I ceppi utilizzati per l'inoculo delle piastre MIC, sono stati diluiti fino a raggiungere un inoculo *standard* di 10⁵ UCC/ml. Le micropiastre utilizzate per l'esecuzione del test (Sensititre®) ed il panel di antibiotici testati con le relative concentrazioni è riportato nella tabella 1.

Il controllo delle piastre è stato eseguito giornalmente al fine di evidenziare il viraggio del pozzetto denominato controllo positivo. Una volta evidenziato tale viraggio la lettura della piastra veniva eseguita annotando in una apposita scheda l'ultimo pozzetto che ha manifestato viraggio indice di metabolismo batterico e quindi crescita e vitalità.

La MIC riportata è rappresentata dalla concentrazione del pozzetto successivo al pozzetto virato.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La scelta dei ceppi sulla base dei dati di categoria ha permesso la selezione di ceppi provenienti dal settore pollo riproduttore, tacchino riproduttore, tacchino da carne e gallina ovaioia. Tali ceppi sono stati ulteriormente analizzati mediante studio del gene *vlhA*. I ceppi che avevano specifiche differenze di sequenza a livello del gene *vlhA* sono stati classificati come “deleti” o “non deleti”.

I ceppi selezionati sono stati 6 di cui due provenienti dal settore pollo riproduttore, due dal settore gallina ovaioia, uno dal settore tacchino da carne e infine uno dal settore pollo da carne.

La lettura della MIC è stata effettuata tra le 24 e 48 ore per tutti i ceppi testati, ed è riportata nella tabella 1. I risultati ottenuti confermano in grandi linee i dati riguardanti la suscettibilità *in vitro* per il *Mycoplasma synoviae* (6). I ceppi da noi testati manifestano una buona suscettibilità *in vitro* per i lincosamidi, le tetracicline ed i macrolidi ad esclusione dell'eritromicina, dato peraltro già dimostrato anche da altri Autori (2). Infine i ceppi da noi testati non sembrerebbero manifestare suscettibilità *in vitro* ai fluorchinoloni.

Tale dato merita sicuramente un futuro approfondimento e valutazione mediante l'incremento del numero di ceppi da testare, anche se si allinea con alcuni recenti risultati che descrivono una riduzione della suscettibilità *in vitro* del *Mycoplasma synoviae* nei confronti di tale classe di molecole (2, 6, 7).

BIBLIOGRAFIA

1. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. Avian Dis. 2010 Jun;54(2):961-4.
2. Dufour-Gesbert, F., Dheilly, A., Marois, C. & Kempf, I. (2006). Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. Veterinary Microbiology, 114, 148-154.
3. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. Avian Pathol. 2009 38(1):77-85.
4. 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.
5. Hannan Peter CT, A review article: Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 2000, 31:373-395.
6. Landman WJM, Mevius DJ, Veldman KT and Feberwee A. In vitro antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma Synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory target of commercial poultry. Avian Pathol. 2008, 37 (4):415-420.
7. Stanley, W.A., Hofacre, C.L., Speksnijder, G., Kleven, S.H. & Aggrey, S.E. (2001). Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin. Avian Diseases, 45, 534-539.

Tabella 1.

	Til	Tilm	Lin	Clin	Eri	Clo	Flor	Spec	Ossi	Dano	Enro	Marb	Tula
Ceppo 1	<0.12	0.5	1	0.25	>32	8	2	2	2	>32	>32	>32	1
Ceppo 2	0.5	8	2	1	>32	8	8	2	2	>32	>32	>32	4
Ceppo 3	<0.12	0.5	2	1	>32	8	32	8	8	8	8	8	2
Ceppo 4	<0.12	0.25	2	0.5	>32	2	2	2	2	32	>32	>32	2
Ceppo 5	<0.12	0.25	1	0.25	>32	8	2	8	2	32	>32	>32	2
Ceppo 6	<0.12	0.25	0.5	<0.12	>32	1	1	1	0.5	8	32	>32	1

Legenda: Til: Tilosina; Tilm: Tilmicosina; Lin: Lincomicina; Clin: Clindamicina; Eri: Eritromicina; Clo: Cloranfenicolo; Flor: Florfenicolo; Spec: Spectinomina; Ossi: Ossitetraciclina; Dano: Danofloxacin; Enro: Enrofloxacin; Marb: Marbofloxacin, Tula: Tulatromicina.

Ceppo 1: MS isolato da riproduttori broiler deleto;
 Ceppo 2: MS isolato da riproduttori broiler non deleto;
 Ceppo 3: MS isolato da broiler non deleto;
 Ceppo 4: MS isolato da tacchini non deleto;
 Ceppo 5: MS isolato da galline ovaiole non deleto;
 Ceppo 6: MS isolato da galline ovaiole non deleto.

CLONI DI *ESCHERICHIA COLI* DI ORIGINE UMANA ED AVIARIA RESISTENTI AI FLUOROCHINOLONI

Graziani C.¹, Giufrè M.¹, Accogli M.¹, Argentieri M.², Giammanco A.³, Lettini A.⁴, Pecile P.⁵, Raglio A.⁶, Staffolani M.⁷, Massi P.⁸, Taddei R.⁸, Fiorentini L.⁸, Tosi G.⁸, Cerquetti M.¹

¹ *Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, Roma*

² *Ospedale Bambino Gesù, Piazza Sant'Onofrio 4, Roma*

³ *Università degli Studi di Palermo, Via del Vespro 13, Palermo*

⁴ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, Legnaro (PD)*

⁵ *Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Largo G.A. Brambilla 3, Firenze*

⁶ *AO Ospedali Riuniti, Largo Barozzi 1, Bergamo*

⁷ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche (Sez. di Macerata), Via dei Velini 11, Macerata*

⁸ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Sez. di Forlì) Via Marchini 1, Forlì*

Summary

Previous studies have suggested that human fluoroquinolone (FQ) resistant *Escherichia coli* strains probably emerged as a consequence of fluoroquinolone use in poultry. Our aim was to identify clones associated with FQ-resistance among human ExPEC strains and to investigate the possible source of these clones.

INTRODUZIONE

Le infezioni extra-intestinali causate da ceppi patogeni di *E. coli* sono molto comuni sia nell'uomo (ExPEC) che nelle specie aviarie (APEC). Nelle specie avicole, tali infezioni sono note come colibacillosi e rappresentano una delle principali cause di mortalità con danni economici rilevanti per gli allevatori (1). I fluorochinoloni (FQ) sono considerati farmaci di scelta per il trattamento di infezioni da ExPEC e l'incremento negli ultimi anni dei ceppi FQ resistenti ha destato preoccupazione per la sanità pubblica. Questi farmaci sono ampiamente utilizzati anche in medicina veterinaria e diversi ceppi resistenti di *E. coli* sono stati isolati nelle specie aviarie. E' stata così ipotizzata una probabile origine zoonotica di questi patogeni che possono infettare l'uomo attraverso l'ingestione di cibo contaminato ed in particolare prodotti avicoli. Lo scopo di questo studio è stato quello di identificare cloni FQ-resistenti nell'uomo e investigare la loro possibile origine aviaria.

MATERIALI E METODI

In totale, sono stati analizzati 378 ceppi di *E. coli* (277 dall'uomo e 101 da specie aviarie). Gli ExPEC (142 FQ-sensibili e 135 FQ-resistenti) sono stati isolati da infezioni urinarie e sepsi in pazienti ambulatoriali o ricoverati presso 4 diversi ospedali italiani. I ceppi d'origine aviaria (68 FQ-sensibili e 33 FQ-resistenti) sono stati collezionati durante l'attività di controllo degli Istituti Zooprofilattici. La sensibilità agli antibiotici è stata determinata attraverso l'utilizzo degli E-test, mentre il gruppo filogenetico è stato determinato con la metodica della PCR (2).

L'identificazione dei principali cloni o complessi clonali circolanti è stata effettuata mediante analisi Multilocus Sequence Typing (MLST) su un campione di ceppi di *E. coli* umani e d'origine aviaria. Inoltre, tutti i ceppi appartenenti al gruppo filogenetico B2 sono stati analizzati per la ricerca del clone ST131 mediante PCR e confermati con MLST.

RISULTATI

La maggior parte dei ceppi resistenti ai fluorochinoloni presentava un fenotipo di multiresistenza (FQ-resistenti-MDR) ed in particolare erano resistenti anche ad ampicillina e trimetoprim/sulfametossazolo sia nei ceppi umani che aviari (30.5% e 60.6%). In generale gli ExPEC appartenevano prevalentemente al gruppo filogenetico B2 (56.7%) e al gruppo D (17.7%), mentre i ceppi aviari appartenevano prevalentemente al gruppo A (34.6%) e al gruppo B1 (29.7%). Nei ceppi umani FQ-resistenti è stato osservato uno shift dal gruppo B2 al gruppo A che non è stato osservato nei ceppi aviari. Mediante analisi MLST i ceppi umani si sono distribuiti in ben 37 sequence types (STs) diversi. Tuttavia, i ceppi FQ-resistenti-MDR sono risultati appartenere prevalentemente al ST131 (40%), seguito da ST23 e ST10 complexes, questi ultimi entrambi appartenenti al gruppo filogenetico A. Al contrario i ceppi FQ-sensibili erano dispersi tra diversi ST e solo il 3.5% erano ST131. Tra i ceppi d'origine aviaria sono stati identificati 27 differenti STs, ma ST 23, ST10 ed ST156 sono risultati i più comuni e ciascuno includeva ceppi MDR-FQ-resistenti. Un solo ceppo ST131 FQ-sensibile è stato identificato tra gli aviari.

DISCUSSIONE

Questo studio ci ha consentito di identificare i principali cloni di *E. coli* associati ad antibiotico resistenza sia nell'uomo sia nelle specie aviarie. Anche se i nostri risultati non supportano l'ipotesi della possibile origine aviaria dei ceppi umani ciprofloxacina resistenti appartenenti al clone ST 131, la condivisione dei cloni ST23 ed ST10 tra i ceppi umani ed aviari pone il problema di un probabile rischio zoonotico.

BIBLIOGRAFIA

1. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiebling S, Alt K, Antão EM, Laturus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Bohnke U, Steinruck H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology* 2007; 297: 163-176.
2. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *E. coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microb* 2000; 66(10):4555-58.

UNA COMBINAZIONE MICROINCAPSULATA DI ACIDO SORBICO E COMPOSTI NATURALI IDENTICI RIDUCE LA PREVALENZA E LA PRESENZA DI *S. ENTERITIDIS* NEL POLLO DA CARNE

Grilli E.¹, Massi P.², Tosi G.², Fiorentini L.², Taddei R.², Tugnoli B.¹, Fantinati P.³, Piva A.¹

¹*DIMORFIPA, Università di Bologna, Bologna*

²*ISZLER Sez Forlì*

³*Vetagro S.p.A., Reggio Emilia*

Summary

The reduction of *Salmonella enteritidis* prevalence in broiler breeding is a priority in EU agricultural policies, as the treatment with antibiotics is forbidden by Regulation (EU) 2160/2003. Therefore, the aim of this study was to assess the efficacy of a microencapsulated blend of sorbic acid and nature-identical compounds (NIC) on the reduction of cecal prevalence and proliferation of *S. enteritidis* in experimental infected broilers chickens. Day-old female Ross 708 chicks, housed in 5 poultry isolators (20 birds/units), were assigned to 5 dietary treatments: positive control (challenged, not treated), AVP 0.3, AVP 1, AVP 2 and AVP 5 (birds challenged and treated with 300, 1000, 2000, and 5000 g/ton, respectively, of the microencapsulated blend AVIprof® , EU pat. 1391155B1, Vetagro S.p.A.). At day 7 of age birds were orally challenged with 10⁵ CFU of *S. enteritidis* and after 7, 14, 24 days, 5, 5 and 10 birds per treatment were sacrificed, respectively, and caeca contents analysed for *S. enteritidis*. Data were analysed with one-way ANOVA. AVP 2 and AVP 5 treatments reduced *S. enteritidis* cecal prevalence by 30% and proliferation by 2 logs after 24 days post-infection (P<0.05). This study confirmed that intestinal delivery of microencapsulated sorbic acid and NIC can result in a reduction of *S. enteritidis* counts by 100-folds.

INTRODUZIONE

La relazione “Community Summary Report on trends and sources of zoonosis and zoonotic agents and foodborne outbreaks in the European Union” riporta che la *Salmonella* è la causa più frequente di epidemie di origine alimentare nel 2008. La carne di pollame è il cibo maggiormente esposto, seguito dalla carne suina. I ceppi più frequentemente isolati di *Salmonella* nei focolai sono stati *S. enteritidis* e *S. typhimurium* nelle carni di pollame e suino rispettivamente.

I numeri indicano una leggera diminuzione nelle persone colpite in caso di focolai di *Salmonella* rispetto al 2007 (131.468 casi nel 2008 vs 151.998 nel 2007), e questo trend, confermato negli ultimi quattro anni, potrebbe essere legato all’applicazione di programmi di monitoraggio nazionali, all’interno di ciascun paese, come stabilito dal Reg. CE 2160/2003. Tale regolamento si prefigge di garantire “la messa in atto di misure efficaci per rilevare e controllare la salmonella e altri agenti zoonotici in tutte le fasi pertinenti la produzione, trasformazione e distribuzione, in particolare a livello della produzione primaria, anche in mangimi, al fine di ridurre la presenza e il pericolo per la salute pubblica “.

Mentre sono stati ottenuti importanti risultati nel corso degli anni per quanto riguarda

le galline ovaiole, dove sono stati raggiunti gli standard europei in molti Paesi, non sono stati raggiunti tali livelli significativi di riduzione della prevalenza di *Salmonella* per i polli da carne.

Pertanto, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia di una miscela di acido sorbico e di Composti Naturali Identici (NIC) sulla riduzione della prevalenza cecale e la proliferazione di *S. enteritidis* in polli da carne infettati sperimentalmente.

MATERIALI E METODI

In tale studio sono stati utilizzati cento broilers Ross 708 femmine, di un giorno di vita e provenienti da un incubatoio dell'Emilia Romagna. Gli animali sono stati stabulati in modo casuale in cinque isolatori per specie aviari (Montair Andersen HM1500®) (20 animali/isolatore) dotato di abbeveratoi, lampade di riscaldamento e di una sistema per la filtrazione dell'aria in entrata ed in uscita. Ad ogni unità di isolamento è stato assegnato uno dei 5 trattamenti alimentari così stabiliti: controllo (non trattato), AVP 0.3, AVP 1, AVP 2 e AVP 5 (animali rispettivamente trattati con 300, 1000, 2000 e 5000 gr/T, della miscela microincapsulata di acido sorbico e di Composti Naturali Identici, AVIprof®, brevetto UE. 1391155B1, Vetagro S.p.A. Italia). La miscela è stata introdotta in un mangime in farina e fornita agli animali sin dall'inizio dello studio. Il mangime è stato fornito *ad libitum*. A 7 giorni di vita i polli sono stati sottoposti ad infezione *per os* con una dose infettante di 10^5 unità formanti colonia (UFC) di *S. enteritidis*. A 7, 14, e 24 giorni post-infezione sono stati sacrificati 5, 5 e 10 capi per ogni trattamento rispettivamente, al fine di analizzare la presenza e la conta delle UFC di *S. enteritidis* nel contenuto cecale secondo il metodo ISO 6759:2002, annex D. È importante sottolineare come per l'infezione sia stato utilizzato un ceppo di campo isolato da galline ovaiole.

I dati sono stati sottoposti all'analisi statistica, tramite test ANOVA ad una via, seguito dal post-Neuman-Keuls test utilizzando GraphPad Prism Software 4.0. Le differenze sono state indicate come significative per $P < 0,05$. La prevalenza di *S. enteritidis* a 24 giorni post-infezione è stata analizzata mediante test Chi-quadro.

Lo studio è stato condotto presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (ISZLER).

RISULTATI E DISCUSSIONE

A 7 giorni post-infezione non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi, ma il trattamento AVP 2 dimostrava un livello di UFC più alto (+1,8 log) rispetto al controllo.

Dopo 14 giorni post-infezione nessuno dei gruppi mostrava differenze statisticamente significative rispetto al controllo. Tuttavia dopo 24 giorni c'è stata una significativa riduzione dei livelli di *S. enteritidis* (pari a 2 log) per entrambi i trattamenti AVP 2 e AVP 5 rispetto al controllo, mentre il trattamento AVP 0,3 non ha dimostrato differenze significative.

Il trattamento AVP 1 ha mostrato una riduzione numerica di 0,5 log senza raggiungere significativi valori di P (Fig. 1).

Durante il corso della prova non si è potuto evidenziare una riduzione della colonizzazione cecale di *S. enteritidis* nei broilers del gruppo di controllo, mentre la riduzione è stata evidente negli animali alimentati con dosi più alte di AVIprof® (Fig. 2). La prevalenza di *S. enteritidis*, 24 giorni post infezione, è stata

significativamente ridotta dal 100% degli animali gruppo di controllo, trattamento AVP 0,3, e AVP 1.0 al 70% nei trattamenti AVP 2,0 e AVP 5,0 ($P < 0,01$). Ciò sta ad indicare una negativizzazione del 30% degli animali quando trattati con 2,0 e 5,0 Kg di AVIprof®.

I dati inoltre hanno messo in evidenza come nel corso del periodo sperimentale la supplementazione del mangime con AVIprof® si è dimostrata in grado di sortire un effetto positivo per gli animali. Tali risultati confermano ciò già visto in precedenza su animali SPF dove si è applicato lo stesso prodotto microincapsulato per il controllo da *S. hadar* (Grilli et. 2009).

Il risultato comune nei due studi è che, mentre non vi è alcun effetto durante i primi giorni post-infezione, si assiste ad una marcata riduzione di *S. enteritidis* in un periodo a medio termine dall'inizio del challenge (20-24 giorni). Nello studio precedente (Grilli et al., 2009), l'inibizione di 1 log di *S. Hadar* è stato raggiunto a 20 giorni post-infezione con tutti i dosaggi di prova (da 300 ppm a 5000 ppm nel mangime), mentre in questo c'è stata una riduzione marcata solo a partire dal dosaggio di 2000 ppm sino a 5000 ppm.

La ragione di questa discrepanza potrebbe essere dovuta a due diverse ragioni. La prima potrebbe essere la differente specie di salmonella utilizzata (*S. Hadar* nel primo e *S. enteritidis* nel secondo) con differenti sensibilità dei diversi ceppi alla combinazione di acidi ed aromi testata. Il secondo punto è che la colonizzazione *S. Hadar* nella prima prova è risultata numericamente minore se confrontata a quella ottenuta nella seconda prova con *S. enteritidis* (2 logs/g vs 5 logs/g di contenuto cecale riferito ai polli di controllo). Infatti, nel primo studio, il picco colonizzazione è stato raggiunto dopo 10 giorni post-infezione con un valore di 3,2 logs/g, mentre nel secondo studio è stato al suo livello massimo a 7 giorni con valori di 7 logs, e quindi la concentrazione di la miscela necessaria per ridurre efficacemente i livelli di *S. enteritidis* sono stati necessariamente superiori.

CONCLUSIONI

In conclusione, AVIprof® è stato in grado di ridurre efficacemente di 2 log la presenza di *S. enteritidis* in infezione sperimentale su broiler commerciali di 31 giorni di età. Tale combinazione di acidi e Composti Naturali Identici, ha inoltre consentito una riduzione del 30% dei polli positivi a Salmonella. Tale colonizzazione inferiore a livello cecale nei polli da carne potrebbe permettere una minore contaminazione della carcassa al macello e quindi una diminuzione del rischio per il consumatore.

BIBLIOGRAFIA

1. EFSA. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* (2010), 1496.
2. GRILLI, E., MASSI, P., VANDI, L. AND A. PIVA. 2009. A microencapsulated blend of organic acids and natural identical compounds reduced the prevalence and presence of *S. hadar* in SPF-chicks 17. European Symposium on Poultry Nutrition, August, 23-27, 2009, Edinburgh, Scotland.
3. THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL. Regulation (EC) 2160/2003 of 17 November 2003 on the control of Salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. Official Journal of European Union- 325/1-15.

Figura 1. Conta di *S. enteritidis* nei contenuti cecali dopo 24 giorni post-infezione. Diverse lettere sulle colonne indicano differenze significative ($P < 0,05$).

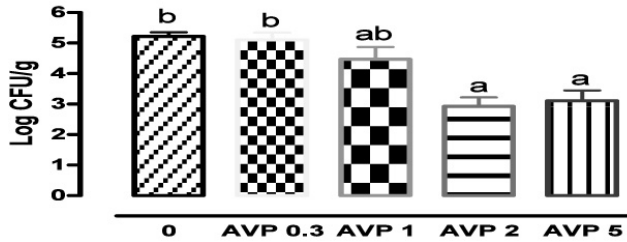
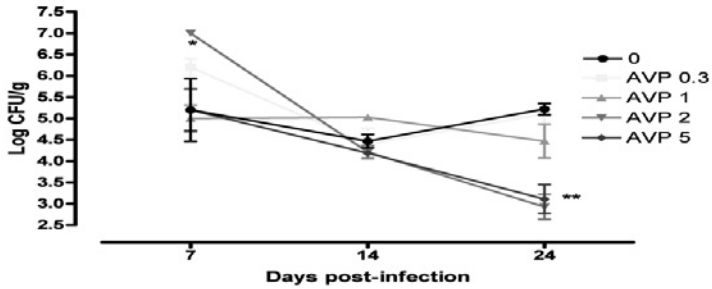


Figura 2. Conta di *S. enteritidis* nei contenuti ciecali nel corso del tempo del periodo sperimentale. L'asterisco indica una differenza significativa rispetto al controllo ($P < 0,05$).



INTERAZIONE FRA VACCINI VIVI PER LA PROFILASSI DELLA RINOTRACHEITE DEL TACCHINO E DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE SOMMINISTRATI IN ASSOCIAZIONE AD UN GIORNO DI VITA NEL TACCHINO

Lupini C.¹, Cecchinato M.², Listorti V.¹, Muñoz O.¹, Terregino C.³, Cecchettin K.³, Catelli E.¹

¹Dipartimento di Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO), Italia;

²Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD), Italia;

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italia

Summary

The combined administration of Newcastle Disease (ND) and avian *Metapneumovirus* (AMPV) live vaccines in turkey hatcheries is advantageous, but compatibility has not yet been demonstrated experimentally. To investigate any possible interference between the two vaccines, AMPV subtype B live vaccine was given to one-day-old turkeys either alone or in combination with two different ND vaccine strains (B1 and VG/GA). AMPV and NDV post vaccination shedding and humoral immune response were assessed. Results showed that following single or combined vaccinations both AMPV and/or ND vaccine virus was detected in the respiratory tract of all of the birds in all groups. In addition, birds were protected from virulent AMPV virus challenge and differences in clinical signs between groups vaccinated with AMPV vaccine alone or in combination with ND vaccine were not statistically significant.

INTRODUZIONE

L'allevamento del tacchino è condotto in sistemi intensivi che, concentrando grandi numeri di animali in spazi ed aree geografiche ridotte, creano le condizioni per una rapida diffusione delle forme infettive. Per diminuire il rischio di focolai di malattia è quindi necessario ricorrere costantemente alla profilassi vaccinale, e la corretta gestione di tali piani, assieme alla applicazione di una adeguata biosicurezza, rappresenta uno dei punti cardine per la redditività dell'impresa avicola. Costanti nel nostro Paese sono gli interventi nel tacchino nei riguardi della Malattia di Newcastle (ND) (Nota del Ministero della Salute, 2005) e della Rinotracheite del Tacchino (TRT) (Catelli, 2006).

La ND, sostenuta da ceppi patogeni di *Paramyxovirus 1*, è una delle più temute malattie del pollame. Essa, quando è sostenuta da ceppi altamente patogeni, ha conseguenze devastanti, non solo per l'elevato tasso di mortalità che può essere raggiunto, ma anche per il forte impatto economico che ne consegue, derivante sia dall'adozione di una politica di eradicazione, sia dalle restrizioni al commercio imposte al Paese sede di focolaio. La TRT, sostenuta dal *Metapneumovirus* aviario (AMPV), è fra le principali patologie virali del tacchino, ed ha diffusione pressoché mondiale. La gravità di questa forma respiratoria è influenzata dall'insorgere di infezioni batteriche secondarie (Catelli, 2009).

Per entrambe le malattie, vaccini vivi vengono spesso somministrati nei primi giorni

di vita ad almeno una settimana di distanza per il timore di una possibile interferenza tra i due virus vaccinali e quindi di riduzione della protezione da essi indotta. La possibilità di associare in incubatoio tali interventi avrebbe numerosi vantaggi di ordine pratico, economico e sanitario. In quest'ottica diventa fondamentale assicurarsi che non ci siano interferenze negative fra i vaccini stessi, tali da compromettere l'efficacia delle vaccinazioni o addirittura causare effetti patologici indesiderati. L'obiettivo del presente lavoro è stato valutare, in condizioni sperimentali, l'interferenza fra due diversi ceppi vaccinali di NDV e uno di AMPV somministrati nel tacchino in associazione ad un giorno di vita, secondo un possibile schema vaccinale praticabile in incubatoio

MATERIALE E METODI

La prova è stata eseguita in condizioni di isolamento biologico in isolatori per pollame ed ha avuto la durata complessiva di 32 giorni. Ottanta tacchinotti commerciali di un giorno di vita sono stati suddivisi in sei gruppi e vaccinati il medesimo giorno secondo il seguente schema:

- ✓ Gruppo TRT (16 animali) - ceppo AMPV sottotipo B VCO3;
- ✓ Gruppo ND1 (8 animali) - ceppo NDV B1;
- ✓ Gruppo ND2 (8 animali) - ceppo NDV VG/GA;
- ✓ Gruppo TRT/ND1 (16 animali) - ceppi AMPV sottotipo B VCO3 e NDV B1, in associazione;
- ✓ Gruppo TRT/ND2 (16 animali) - ceppi AMPV sottotipo B VCO3 e NDV VG/GA, in associazione.
- ✓ Gruppo di controllo (16 animali) - inoculati con acqua sterile.

I vaccini o l'associazione vaccinale sono stati somministrati alle dosi consigliate dalla casa produttrice.

Gli animali sono stati monitorati quotidianamente per l'eventuale comparsa di sintomatologia clinica post-vaccinale. L'eliminazione respiratoria dei virus vaccinali è stata valutata, in 8 soggetti per gruppo, da tamponi oro-faringei prelevati a tempi stabiliti (2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22, 26 e 30 giorni post-vaccinazione) al fine di valutare l'entità della colonizzazione e della replicazione dei virus vaccinali nelle sedi di elezione.

A tale scopo l'RNA è stato estratto mediante il metodo descritto da Li *et al.* (1993) e sottoposto a Real Time RT-PCR (RRT-PCR). Per NDV è stato utilizzato il metodo descritto da Cattoli *et al.* (2009). Per AMPV è stata utilizzato un protocollo di RRT-PCR che prevedeva l'utilizzo di una sonda *Molecular Beacon* sottotipo B specifica, disegnata sulla sequenza del gene che codifica per la *Small hydrophobic protein*. La *reaction mix* impiegata aveva un volume finale di 10 µl ed era composta da: 0,25 µl di SuperscriptIII RT/Platinum Taq mix, 5 µl di 2x *reaction mix*, 0,5 µl di ogni primer [SH forward ed SH reverse (20 µM)], 0,38 µl di sonda [MB SH B (20µM)], 2,43 µl di acqua per biologia molecolare e 1 µl di RNA virale. Per la preparazione della *reaction mix* si è usato il kit SuperScript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Life technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il programma di amplificazione impiegato prevedeva una prima fase di retrotrascrizione a 45°C per 30 minuti, dopodiché il campione veniva sottoposto per 2 minuti a 95°C, ed in seguito a 45 cicli di: denaturazione a 95°C per 15 secondi, *annealing* a 45°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 0,5 secondi. Al termine la piastra veniva raffreddata a 40°C per

30 secondi. L'acquisizione della fluorescenza avveniva a 45°C. Tutti i campioni con *Crossing Point* (CP) <35 erano considerati positivi.

A 7, 14, 21 e 28 giorni post-vaccinazione sono stati svolti esami sierologici per la ricerca degli anticorpi anti-AMPV, mediante tecnica ELISA (kit ELISA Flockchek® APV Ab, IDEXX Laboratories), e anti-NDV, mediante inibizione dell'emoagglutinazione (HI) (DPR 657/96). Le medie dei titoli anticorpali sono state paragonate utilizzando il test *t* di Student. Con *p*-value <0,05 la differenza è stata considerata statisticamente significativa.

A 21 giorni di vita, otto animali dei gruppi TRT, TRT/ND1, TRT/ND2 e Controllo sono stati movimentati in altri isolatori e sottoposti al challenge con AMPV sottotipo B (ceppo IT/Ty/Vr240/87) alla dose di 3,77 log₁₀ CD₅₀/soggetto. Dal 1° giorno post-infezione (p.i.) fino al termine della prova è stata valutata quotidianamente la sintomatologia clinica, assegnando ad ogni animale un punteggio, seguendo il metodo descritto da Naylor e Jones (1994). Il confronto tra i gruppi è stato condotto utilizzando il test U di Mann Whitney. Con *p*-value <0,05 la differenza è stata considerata statisticamente significativa.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nessun gruppo ha mostrato sintomatologia clinica dopo la vaccinazione.

L'andamento del numero di soggetti positivi/giorno alla Real Time RT-PCR per NDV, è sovrapponibile in tutti i gruppi vaccinati (figura 1). Al quarto giorno post-vaccinazione (p.v.) l'eliminazione virale interessa tutti i soggetti vaccinati. Il numero di soggetti positivi/gruppo decresce in maniera significativa dopo il decimo giorno p.v.

Il numero totale di soggetti positivi alla RRT-PCR per AMPV nei 30 giorni successivi alla vaccinazione differisce solo lievemente fra i tre gruppi vaccinati (tabella 1). Importante sottolineare che al 14° giorno p.v. tutti gli animali hanno eliminato almeno una volta AMPV.

Non risulta esserci differenza statisticamente significativa (*p*>0.05) tra i titoli anticorpali per AMPV dei gruppi vaccinati e del gruppo di controllo sino a 21 giorni post-vaccinazione (figura 2). A 28 giorni post-vaccinazione la media dei titoli anticorpali risulta invece essere differente tra i gruppi vaccinati in associazione rispetto al gruppo controllo e TRT a svantaggio di questi ultimi (*p*<0.05). Tali risultati sono analoghi a quello ottenuti nel pollo da Ganapathy *et al.* (2006), e necessitano ulteriori approfondimenti per essere spiegati.

Le medie dei titoli anticorpali HI per NDV nei gruppi vaccinati e di controllo (figura 3) decrescono sino al giorno 21 p.v. senza mostrare differenze significative tra loro (*p*>0,05). Al 28° giorno si evidenzia invece una differenza significativa fra il gruppo di controllo ed i gruppi vaccinati (*p*<0,05). Non c'è invece mai differenza significativa fra i gruppi che hanno ricevuto i vaccini ND1 o ND2 sia in singolo che in associazione. In seguito all'infezione con AMPV i soggetti del gruppo di controllo, non vaccinati, hanno mostrato la sintomatologia attesa con un punteggio medio cumulativo, nel periodo di osservazione, pari a 15,25; significativamente maggiore (*p*<0.05) rispetto ai gruppi vaccinati.

Nessuna differenza statisticamente significativa (*p*>0.05) si è osservata fra i tre gruppi vaccinati, mostrando come sia sovrapponibile il grado di protezione conferito dal vaccino AMPV somministrato in singolo o in associazione con NDV (figura 4).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti permettono di concludere che la somministrazione al tacchino di un giorno di vita di vaccino vivo attenuato AMPV ceppo VC03, in associazione con i vaccini vivi NDV sia ceppo B1 sia ceppo VG/GA, conferisce protezione al challenge con AMPV sovrapponibile a quella evocata dal vaccino somministrato singolarmente, e non interferisce nella replicazione dei virus vaccinali a livello respiratorio.

Resta da verificare se la protezione nei riguardi di NDV a seguito di vaccinazione combinata sia sovrapponibile a quella ottenibile con la vaccinazione singola. Il valore di *shedding* dei virus ND vaccinali simile nei differenti gruppi porta a pensare che la colonizzazione e l'entità di replicazione nei tessuti d'elezione di questi virus, e di conseguenza l'immunità da essi indotta, non sia stata ridimensionata dalla somministrazione contemporanea con AMPV. Questo vale sia per il virus vaccinale a tropismo respiratorio (B1) sia per il virus a maggior tropismo enterico (VG/GA). Anche l'andamento dei titoli anticorpali ND in tutti i gruppi vaccinati sia in singolo che in associazione induce a pensare che non vi sia stata una significativa interferenza del vaccino AMPV a scapito dei vaccini NDV considerati.

La dimostrazione dell'efficacia nel tacchino di piani vaccinali che prevedano la contemporanea somministrazione di vaccini vivi attenuati per AMPV e NDV in incubatoio può avere importanti risvolti in quanto la riduzione dei singoli interventi vaccinali determina un abbattimento dei costi ad essi correlati e limitazione dello stress provocato agli animali dagli interventi stessi. Inoltre la possibilità di anticipare la vaccinazione per NDV al primo giorno di vita in incubatoio permetterebbe l'instaurarsi di un'immunità protettiva più precocemente, riducendo il periodo in cui gli animali risultano scoperti dal punto di vista immunitario nei confronti di virus potenzialmente pericolosi e permetterebbe di ridurre l'uso delle squadre di vaccinazione in campo che spesso hanno contribuito alla diffusione di virus patogeni in corso di epidemia.

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata dal Ministero della Salute (RC IZSVe 26/07) e dell'Alma Mater Studiorum- Università di Bologna (RFO 2007).

BIBLIOGRAFIA

1. Catelli E (2006). Dati epidemiologici sulle infezioni da Pneumovirus Aviare in Italia. Giornata di studio Intervet su "Malattie respiratorie e problemi di produzione", 16-23.
2. Catelli E (2009). Infezioni da Paramyxoviridae. In: Asdrubali G., Fioretti A. (Eds.) *Manuale di Patologia Aviare*. PVI, Point Veterinaire Italie, Milano, pp. 137 – 154.
3. Cattoli G, De Battisti C, Marciano S, Ormelli S, Monne I, Terregino C, Capua I (2009). False-Negative Results of a Validated Real-Time PCR Protocol for Diagnosis of Newcastle Disease Due to Genetic Variability of the Matrix Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (11): 3791-3792.
4. D.P.R. n. 657 del 15 novembre 1996. Regolamento per l'attuazione della direttiva 92/66/CEE che prevede misure comunitarie contro la malattia di Newcastle.

- Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale* n. 300 del 23 dicembre 1996.
5. Ganapathy K, Todd V, Cargill P, Montiel E, Jones RC (2006). Interaction between a live avian pneumovirus vaccine and two different Newcastle disease virus vaccines in broiler chickens with maternal antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathology*, 35: 429-434.
 6. Li J, Cook JKA, Brown TDK, Shaw K And Cavanagh D (1993). Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 22: 771-783.
 7. Naylor CJ e Jones RC (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine*, 12 (13): 1225-1230.
 8. Nota del Ministero della Salute DGVA VIII 29204/P-I.8.d/158 dell'8/08/2005.

Figura 1: Numero di animali positivi/giorno alla Real time RT-PCR per virus vaccinale NDV.

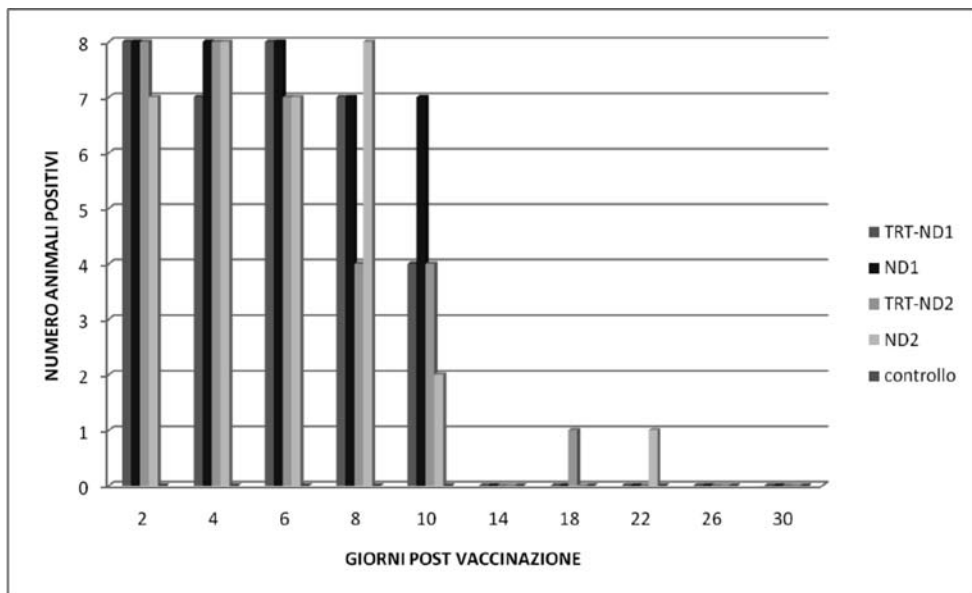


Tabella 1: Positività post-vaccinali alla RRT-PCR per AMPV in tamponi oro-faringei.

Giorno post-vaccinazione	Numero di soggetti positivi per AMPV			
	TRT	TRT/ND1	TRT/ND2	CONTROLLO
2	0	1	0	0
4	1	0	0	0
6	4	1	3	0
8	2	0	4	0
10	5	2	5	0
14	7	7	6	0
18	4	8	4	0
22	0	4	1	0
26	2	1	0	0
30	2	2	0	0
TOTALE	27	26	23	0

Figura 2: Andamento delle medie dei titoli anticorpali per AMPV evidenziati con test ELISA, nei gruppi vaccinati e non vaccinati.

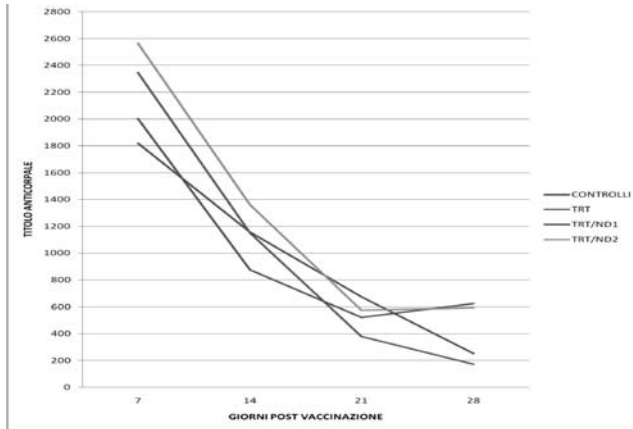


Figura 3: Evoluzione della media geometrica dei titoli anticorpali HI (\log_2) nei confronti dell'NDV nei gruppi sperimentali.

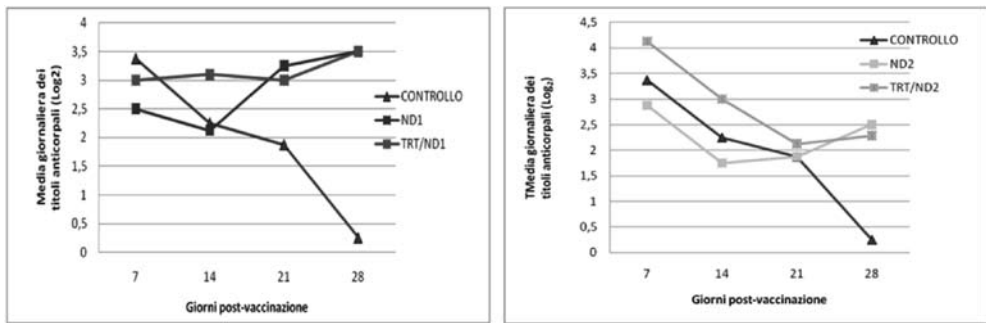
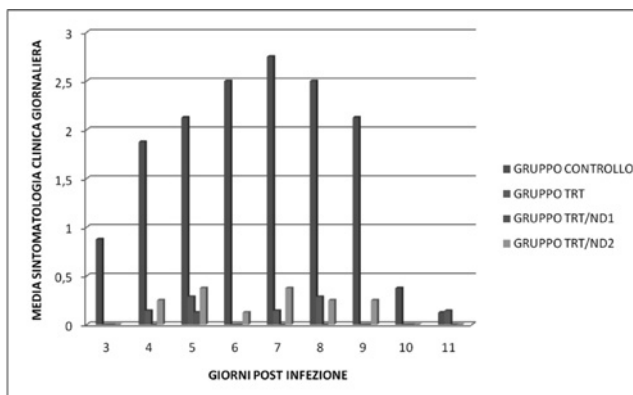


Figura 4: Media delle osservazioni cliniche giornaliere dei gruppi vaccinati e del gruppo di controllo a seguito di challenge con AMPV.



MIOPATIA DEGENERATIVA MULTIFOCALE DEL MUSCOLO PETTORALE SUPERFICIALE IN POLLI DA CARNE

Manarolla G., Rampin T., Muccioli F., Sironi G.

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Via Celoria 10, 20133 MILANO.

Summary

Gross lesions consisting of multifocal whitish streaks observed in the breast muscles of slaughtered broilers were evaluated histologically. These pathological changes were characterized by hyaline degeneration, fragmentation and necrosis of myofibres associated with lymphocytic and heterophilic infiltration. Multifocally, atrophied muscle fibres were replaced by adipose tissue. Such lesions were detectable also in grossly normal breast muscles. Samples of other skeletal muscles revealed minor lesions. Heart and smooth muscle were unaffected. Pathogenetical hypothesis considering a possible insufficient blood supply is discussed.

INTRODUZIONE

Nell'animale da carne la qualità della carcassa dopo l'abbattimento dipende massimamente dalle caratteristiche della muscolatura scheletrica, sia come sviluppo e conformazione sia per gli aspetti più specificamente legati all'integrità del tessuto muscolare. In questo contesto lo studio delle alterazioni della muscolatura scheletrica e delle loro cause assumono una particolare rilevanza. Nella produzione di carne avicola il muscolo di maggior interesse commerciale è rappresentato dal petto. La miopatia qui descritta è un fenomeno che viene segnalato al macello in partite di polli da carne apparentemente normali per quanto riguarda il ciclo di produzione e risultati produttivi e che non pare avere correlazioni con problemi sanitari di campo. La sua presenza costituisce un problema in quanto altera visibilmente l'aspetto del muscolo pettorale quale taglio anatomico.

MATERIALI E METODI

In un macello di broiler sono stati prelevati campioni di petti con presenza di lesioni muscolari da 4 partite, per documentare diversi gradi di gravità del fenomeno e formulare una scala di gravità delle lesioni del pettorale.

In campo i campionamenti hanno riguardato 11 partite di broiler diverse per età, sesso, linea genetica e allevamento, allo scopo di definire la natura e l'evoluzione delle lesioni del pettorale. Controlli paralleli sono stati fatti su altra muscolatura scheletrica (arto inferiore), miocardio e muscolatura liscia del ventriglio. Infine è stato fatto un confronto tra fibre muscolari di muscoli pettorali di broiler e pollastre commerciali. I campioni di tessuto muscolare sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e processati secondo la normale routine della Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare fino ad ottenere sezioni di 4 µm di spessore colorate con Ematossilina-Eosina (EE).

Di tutte le partite di polli da carne della parte sperimentale sono stati raccolti i dati di produzione e parallelamente al macello è stato inoltre istituito un sistema di rilevazione e quantificazione del fenomeno (dati qui non riportati).

RISULTATI

Le caratteristiche di questa miopatia del pettorale superficiale del boiler si possono così sintetizzare:

1. Macroscopicamente il muscolo pettorale superficiale colpito si presenta in superficie con striature parallele pallide e lievemente depresse. Questo aspetto striato è molto più difficilmente apprezzabile profondamente nella massa muscolare. Aspetti simili anche se meno evidenti possono interessare la superficie del pettorale profondo. Le striature sopra descritte possono variare ampiamente per numero, diametro e densità.
2. Le lesioni microscopiche consistono prettamente in degenerazione ialina, necrosi a zolle ed infiltrazione linfocitocitaria. Fenomeni di metaplasia adiposa, con progressiva sostituzione di fasci di fibre muscolari con tessuto adiposo sono di frequente riscontro e conferiscono il caratteristico aspetto striato.
3. Anche in petti con assenza di lesioni macroscopiche si riscontrano lesioni istologiche.
4. Nei soggetti che presentano tali alterazioni al pettorale superficiale, la muscolatura striata cardiaca e quella liscia della parete del ventriglio non presentano reperti di rilievo mentre quella della coscia può mostrare lesioni analoghe di minor gravità ed estensione.
5. Le lesioni a carico del pettorale possono cominciare già a 20-21 giorni di vita.
6. Alla rilevazione del fenomeno al macello, si sono ottenuti dati riguardo all'entità del fenomeno nelle partite macellate. Ad una prima analisi dei dati non è emersa alcuna correlazione con dati relativi a età, sesso, peso alla macellazione, mortalità del ciclo.
7. La profilassi anticoccidica con antibiotici ionofori non sembra avere un ruolo nell'insorgenza di questa miopatia.
8. Nel seppur limitato numero di campioni di pettorale di pollastre non sono rilevabili le alterazioni delle fibre muscolari che caratterizzano la miopatia in oggetto. Si conferma la differenza di dimensioni tra le fibre muscolari del pollo da carne e quelle delle linee leggere.

DISCUSSIONE

Sulla base dei nostri risultati, proponiamo la denominazione di miopatia degenerativa multifocale del muscolo pettorale superficiale del pollo da carne per descrivere le alterazioni in questione. Si tratta di lesioni molto comuni addirittura riscontrabili in prodotti in vendita nella grande distribuzione e provenienti da diverse aziende. Inoltre, alterazioni simili a questa miopatia del boiler si osservano anche nei petti di tacchino, tanto che è giustificato sospettare che essa sia presente anche in quest'ultima specie. Sulla patogenesi si possono formulare le seguenti considerazioni.

Le case di selezione hanno selezionato linee commerciali di polli da carne sempre più pesanti e con petto sviluppato (Havenstain et al., 2003 a, b). La differenza esistente tra il petto di soggetto di linea pesante e uno di linea leggera è dovuta sia al numero di fibre sia alla dimensioni delle stesse (Scheuermann et al., 2004). Il numero delle fibre muscolari può aumentare solo durante lo sviluppo embrionario

(iperplasia), la loro dimensione aumenta invece dopo la nascita (ipertrofia). Si può ipotizzare che la selezione delle linee pesanti abbia portato ad un tale aumento sia del numero sia della dimensione delle fibre muscolari da superare, a un certo punto della crescita, la capacità del sistema circolatorio di supporto (MacRae et al., 2007). Del resto se si considera la ripartizione percentuale della gittata cardiaca negli uccelli, si può notare come ai muscoli pettorali sia destinato in media meno del 2% (Smith et al., 2000). In quest'ottica, la miopatia degenerativa multifocale del pettorale superficiale si può spiegare come dovuta alla sofferenza metabolica di fibre ipertrofiche insufficientemente irrorate che si manifesta gradualmente durante l'accrescimento dell'animale interessando fibre singole o a fasci nello spessore del muscolo. Il fatto che le lesioni più evidenti siano anche le più superficiali e coinvolgano non singole fibre ma fasci di più fibre, dando quell'aspetto striato che si rende evidente subito sotto la fascia muscolare, sembra rafforzare questa ipotesi. Infatti le fibre più superficiali sono quelle più distanti dai rami dell'arteria toracica che irrorano le masse pettorali. A sostegno di questa ipotesi patogenetica verranno condotte ulteriori indagini per verificare se esistono differenze d'incidenza di questa miopatia tra le linee commerciali con diversa conformazione del petto.

BIBLIOGRAFIA

1. Havenstein G.B., Ferket P. R., Qureshi M.A. (2003 a) Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* 82:1500–1508.
2. Havenstein G.B., Ferket P. R., Qureshi M.A. (2003 b) Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* 82:1509–1518.
3. MacRae V.E., Mahon M., Gilpin S., Sandercock D.A., Hunter R. R., Mitchell M. A. (2007) A comparison of breast muscle characteristics in three broiler great-grandparent lines. *Poultry Science* 86:382–385.
4. Scheuermann G.N., Bilgili S.F., Tuzun S., Mulvaney D.R. (2004) Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. *Poultry Science* 83, 1404-1412,
5. Smith F.M., West N.H., Jones D.R. (2000) The cardiovascular system – Cap.9. In Sturkie's Avian Physiology , 5° edizione, Academic Press, San Diego, CA. pag. 171.

UTILIZZO DEGLI OLII ESSENZIALI ED ESTRATTI DI PIANTE PER IL CONTROLLO DELLA *SALMONELLA SPP.*, *E. COLI* E *CAMPYLOBACTER* NELLE PRODUZIONI AVICOLE

Mercier L.¹, Ranieri L.²

¹*Chemifarma, Canada* - ²*Chemifarma, Italia*

Summary

The use of essential oils in the intensive rearing of poultry, meet the modern requirements of EU in terms of public health. The article report some in field experiences with essential oils in France and Canada. The use of essential oils is useful to reduce the incidence of poultry pathology without problems of antimicrobial resistance.

INTRODUZIONE

L'obiettivo di preservare la salute del consumatore è oggi una richiesta imposta a tutta la filiera avicola europea. Possiamo legittimamente supporre che tale richiesta sia comune anche ad altri settori. L'evoluzione dei Paesi emergenti e gli scambi commerciali accelerano tale processo.

Le ripercussioni pratiche di tale evoluzione si riassumono in 3 punti principali:

- non utilizzare antibiotici nel mangime = sicura assenza di residui in carni e uova;
- stabilire rigorose procedure per eradicare tossi-infezioni alimentari lungo la filiera = un corretto management della contaminazione da *Salmonella* e *Campylobacter* soprattutto;
- non creare resistenza ai gruppi di antibiotici utilizzati in campo umano = eliminare la pratica di prevenzione antibiotica sistematica o eccessiva metafilassi.

Per ottenere questi obiettivi, occorre lavorare in più direzioni. Il controllo delle disbatteriosi nel periodo di allevamento è la maggior richiesta della produzione avicola, con la sfida di preservare la salute umana ed assicurare un continuo stato di salute positivo del gruppo. Lo scopo del presente articolo è dimostrare che l'utilizzo di estratti vegetali può essere una di queste nuove soluzioni.

Casi di tossinfezioni alimentari

E. coli e *Campylobacter* sono naturalmente presenti nella flora intestinale di avicoli ed uomo, ed alcune famiglie e sierotipi sono patogeni per entrambi. Inoltre la *Salmonella* può essere presente negli avicoli e di qui infettare il consumatore.

Tabella 1. Rapporto InVS/AFSSA (Francia) Giugno 2003. Numero di casi di tossinfezione alimentare diagnosticati nel programma di monitoraggio.

<i>Germes</i>	<i>Listed cases</i>	<i>Hospitalizations</i>	<i>Death</i>
Campylobacter	12 726 - 17 322	2 598 - 3 516	13 - 18
E.Coli (STEC*)	373 - 747	110 - 220	0 - 1
Typhimurium Salmonella			
Other Salmonellas	30 598 - 41 139	5691 - 10 202	92 - 535

*STEC = *Shiga toxin producing Escherichia coli*.

Antibiotico-resistenza

La presenza di batteri negli avicoli determina interventi con antibiotici per prevenire o curare casi di malattia. Questi non si possono evitare, ma, se non correttamente gestiti, provocano un aumento dell'antibiotico-resistenza.

Tabella 2. Rapporto AFSA (Francia) 2009. Monitoraggio dell'antibiotico-resistenza in Francia (*Campylobacter* ed *E. coli*).

<i>French antimicrobial resistances monitoring program</i>				
<i>AFSAA Report (France) - 2009</i>				
<i>Antibiotics</i>	<i>Years</i>	<i>Campylobacter</i>		<i>E.coli</i>
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	
Ampicillin	2005	21.5	48.2	36.6
	2006	32.2	45.9	46.5
Erythromycin	2005	0	3.1	ND
	2006	3.8	7.9	ND
Gentamicin	2005	0	0	2.1
	2006	3.8	0	0
Tetracyclin	2005	44.9	78.0	82.1
	2006	61.6	78.8	78.2

ND = Not determined

La Comunità Europea dal 2005 ha monitorato le percentuali di antibiotico-resistenza dei 5 principali sierotipi di salmonella.

Tabella 3. Rapporto AFSA (Francia) 2009. Monitoraggio dell'antibiotico-resistenza in Francia (*Salmonella*).

<i>French antimicrobial resistances monitoring program</i>					
<i>AFSAA Report (France) - 2009</i>					
<i>Antibiotics</i>	<i>Salmonella strains</i>				
	<i>Enteritidis</i>	<i>Typhimurium</i>	<i>Hadar</i>	<i>Infantis</i>	<i>Virchow</i>
Ampicillin	7.5	22.5	59.0	0	0
Erythromycin	0	0	1.0	18.5	0
Gentamicin	0	3.5	0	0	0
Tetracyclin	4.5	23.5	72.5	0	0

Un'alternativa: **chimica delle piante.**

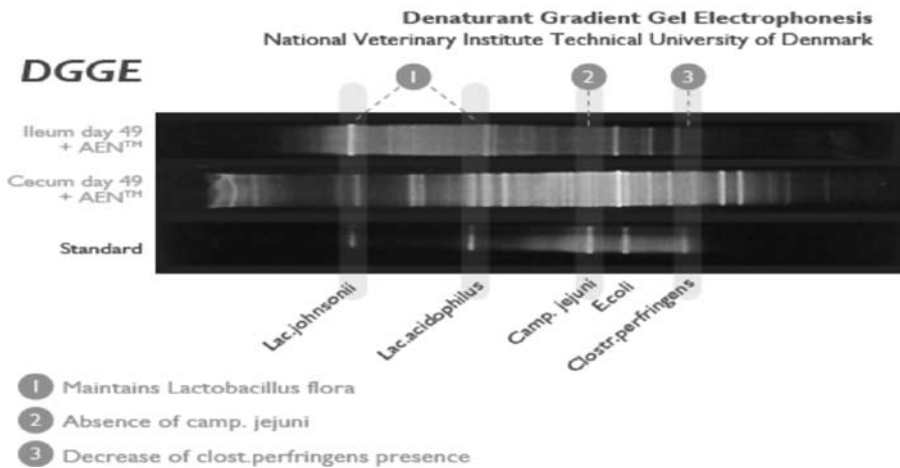
Gli antibiotici sono generalmente molecole naturali ottenute a partire da piante o microorganismi; gli olii essenziali sono estratti direttamente dalle piante = le 2 grandi famiglie (fenoli ed aldeidi) hanno attività riconosciute dalla Farmacopea.

Gli antibiotici inibiscono alcuni processi vitali del microorganismo target; gli olii essenziali (sia nella componente fenolica che aldeidica) hanno principalmente un'azione sulla membrana citoplasmatica, rendendo permeabile la parete batterica ed inibendone la moltiplicazione.

Gli antibiotici vengono spesso associati per aumentarne lo spettro d'azione; gli olii essenziali sono già in natura associati.

L'attività degli olii essenziali è al giorno d'oggi valutabile scientificamente; il cromatogramma seguente ottenuto per elettroforesi evidenzia lo spettro di attività del prodotto AEN (miscela di olii essenziali).

Figura 1



1. Mantiene inalterata la flora intestinale ‘buona’ (*Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus acidophilus*)
2. Contrasta il *Campylobacter jejuni*
3. Controlla la presenza di *Clostridium perfringens*

Figura 2. Modello di azione farmacodinamica dei fitoterapici.

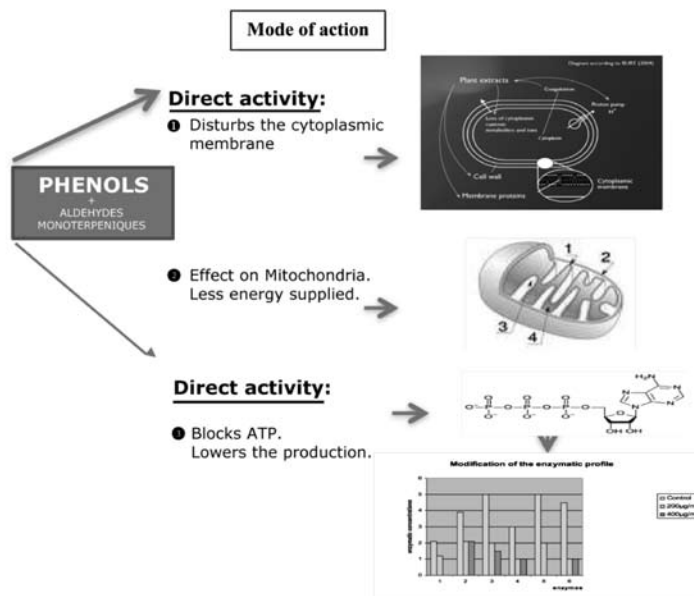
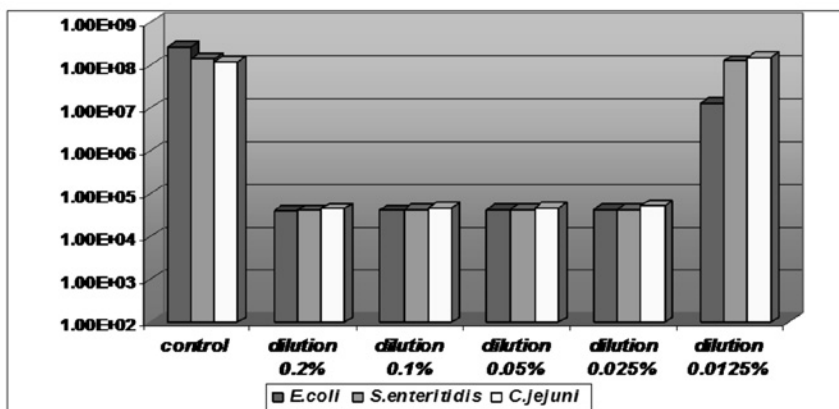


Figura 3. Valutazione dell'attività antibatterica in vitro (MIC).



Il grafico evidenzia che *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Campylobacter jejuni* sono sensibili al prodotto fitoterapico nel range di concentrazioni compreso tra 0,2% e 0,025%. L'ulteriore diluizione allo 0,0125% dimostra un'attività molto minore, paragonabile al controllo non trattato.

Prove di campo

A. Francia: in un incubatoio un gruppo di parent PM3 (12000 galline e 1000 galli) evidenziavano un'elevata mortalità nella prima settimana di accasamento, dovuta alla presenza di *E. coli*, diagnosticata dal laboratorio di analisi. Immediatamente gli animali vengono trattati con tetraciclina, ma si è osservato che ad una immediata riduzione della mortalità è seguito un pesante aumento della stessa al termine del trattamento.

Nuove prove di laboratorio hanno evidenziato una generale farmacoresistenza; pertanto il veterinario responsabile decide di utilizzare un prodotto fitoterapico (Phyto CSC) alla dose di 750 g/ton di mangime dalla 26° alla 32° settimana.

Figura 4. Mortalità dei parent stock.

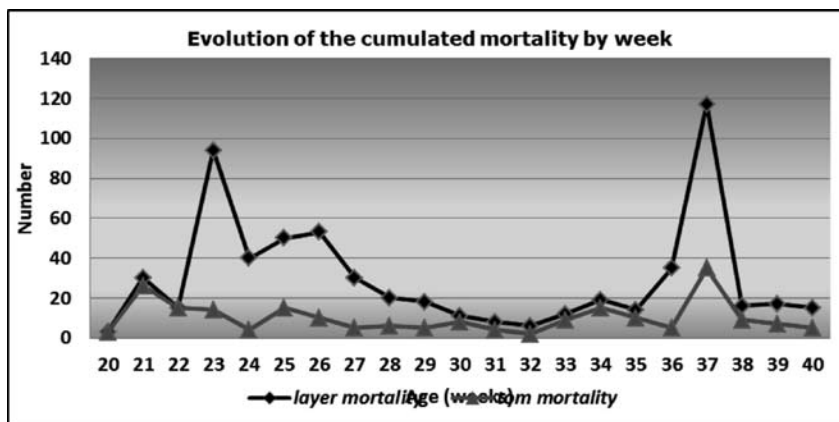


Tabella 4.

<i>Age</i>	<i>Sample</i>	<i>Results</i>
Week 24	2 times 10 chicks	100% negative
Week 28	2 times 10 chicks	100% negative
Week 32	2 times 10 chicks	100% negative

Risultati

- la terapia antibiotica alla 21° settimana con tetraciclina non ha risolto il problema;
- l'utilizzo di Phyto CSC dalla 26° settimana ha ridotto significativamente la mortalità;
- un secondo trattamento antibiotico (sempre tetraciclina) alla 36° settimana è risultato efficace;
- non è stata evidenziata presenza di *E. coli* tra i pulcini prodotti.

B. Canada: gruppo di riproduttori pesanti con presenza di *Salmonella enteritidis* quindi destinati alla macellazione.

- Misure di biosicurezza: aumento delle procedure di disinfezione degli ambienti;
- vaccinazione con vaccino inattivato dopo la 16° settimana;
- trasferimento delle pollastre alla 24° settimana;
- vaccinazione di tutti gli altri capannoni di parents presenti nelle vicinanze.

Programma di interventi fitoterapici:

dal giorno 42 al trasferimento, Phyto CSC alla dose di 750 g/ton di mangime, in continuità;

dal trasferimento alla 24° settimana, Phyto CSC alla dose di 500 g/ton di mangime, in continuità.

Risultati

- tutti i prelievi (sia sui pulcini che sulle galline) sono risultati negativi;
- tutti test sulle prime feci del pulcino sono risultati negativi;
- tutti gli allevamenti nelle vicinanze, vaccinati, sono risultati positivi;
- eccellente vitalità dei riproduttori, superiore alla media;
- uova più pulite;
- assenza di problemi articolari;
- significativa riduzione della mortalità nei pulcini prodotti rispetto agli altri gruppi non trattati.

Programma utilizzato negli allevamenti di filiera.

Broiler: 500 g di Phyto CSC/ton di mangime fino al 21° giorno.

Ovaiole e riproduttori: 500-750 g di Phyto CSC/ton di mangime per le prime 6 settimane, 4 settimane di sospensione seguite da 2 settimane di trattamento, fino alla fine del ciclo.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA: AGGIORNAMENTO SUI DATI RACCOLTI NEL CORSO DELL'ANNO 2010

Taddei R.¹, Tosi G.¹, Barbieri I.², Fiorentini L.¹, Massi P.¹, Boniotti B.

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Forlì, Via Marchini, 1 - 47100 Forlì.*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Reparto di Genomica - Sede di Brescia, via Bianchi, 9 - 25124 Brescia.*

Summary

The molecular characterization of infectious bronchitis virus detected in Italy during 2010 is reported. Identification of IBV was performed by RT-PCR followed by partial sequencing of the hypervariable region of the S1 gene. 213 IBV isolates were characterized. 793B confirmed to be the dominant genotype (49.8%). The second most common genotype resulted QX (29.6%), followed by Massachusetts (12.2%) and It02 (5.6%). Genotypes B1648, D274 and 624/I were also rarely detected.

INTRODUZIONE

Il virus della Bronchite Infettiva Aviare (IBV) è un coronavirus, prototipo della famiglia Coronaviridae, con genoma RNA a singolo filamento e provvisto d'envelope. E' causa della bronchite infettiva aviare, patologia largamente diffusa e responsabile di elevate perdite economiche nell'allevamento intensivo del pollo. Si tratta di una malattia altamente contagiosa, caratterizzata da sintomi e lesioni respiratorie, che in alcuni casi può interessare anche gli apparati gastrointestinale ed uro-genitale causando nefropatie con alta mortalità e/o problemi alla deposizione e alla qualità del guscio dell'uovo nelle galline ovaiole. Il genoma del virus codifica per 4 proteine strutturali: la glicoproteina spike (S), il Nucleocapside (N), la glicoproteina di membrana (M) e la proteina dell'envelope (E). La proteina S, ed in particolare il frammento S1, è la parte più esposta del virus che interviene nell'attacco alla cellula ospite, comprende la maggior parte dei determinanti antigenici ed è pertanto responsabile della formazione di nuove varianti. Nel corso degli anni sono state innumerevoli le varianti isolate in campo, differenti fra loro dal punto di vista sierologico, genotipico e patogenetico. Attualmente sono stati descritti più di 50 sierotipi e si assiste alla periodica comparsa di nuovi. Le problematiche legate al controllo della bronchite infettiva, dovute principalmente alla notevole variabilità antigenica dell'IBV ed alla bassa cross-protezione tra sierotipi differenti, rendono necessario il costante monitoraggio dei ceppi circolanti sul territorio nazionale in modo da poter improntare misure efficaci di profilassi.

Questo studio si prefigge di caratterizzare a livello molecolare i ceppi di IBV attualmente circolanti sul territorio nazionale, mediante analisi di RT-PCR e successivo sequenziamento di una parte della regione ipervariabile del gene S1.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Questo studio è stato effettuato sui campioni conferiti presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I campioni conferiti comprendono animali vivi con segni clinici, animali deceduti, visceri, tamponi tracheali. In particolare, sono stati inclusi nell'analisi:

- tamponi tracheali conferiti presso la sezione con richiesta di ricerca di IBV
- campioni di organo (trachea, rene, tonsille cecali, ovaio, ovidutto) prelevati in sede autoptica da soggetti in cui vi fosse sospetto di bronchite infettiva
- campioni di organi di animali sottoposti a monitoraggio di controllo per sindromi respiratorie senza specifici sospetti diagnostici.

Caratterizzazione molecolare di IBV

La ricerca del virus IBV è stata condotta mediante RT-PCR. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit di estrazione RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornita dalla ditta produttrice. La reazione di RT-PCR, è stata 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 sono state 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, l'amplificato ottenuto è stato sottoposto a sequenziamento. 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. 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).

RISULTATI

Nel corso dell'anno 2010 sono stati analizzati 611 campioni per la ricerca di IBV, composti da 196 tamponi e 415 carcasse. 281 campioni sono risultati positivi alla RT-PCR e sottoposti a successivo sequenziamento. Di questi, sono stati esclusi dall'analisi tutti quelli che rientravano nei seguenti casi:

- Campioni risultati positivi provenienti da gruppi vaccinati da almeno tre settimane nei confronti del ceppo di IBV riscontrato. Il limite di tre settimane è stato posto sulla base dei dati disponibili in letteratura sulla persistenza dei ceppi vaccinali di IBV (5).
- Campioni positivi provenienti da un allevamento in cui era già stato identificato il genotipo di IBV rilevato.

I dati così elaborati comprendono 213 campioni provenienti da 164 allevamenti localizzati in 16 regioni italiane.

Nella tabella 1 sono riassunte le identificazioni molecolari effettuate, suddivise per genotipo. Sono stati identificati 7 differenti genotipi circolanti sul territorio nazionale

(793B, QX, It02, Massachusetts, D274, B1648 e 624/I).

Nella tabella 2 i genotipi identificati sono suddivisi per distribuzione geografica e nella tabella 3 per tipologia produttiva (ovaiole, riproduttori boiler e pollastre).

Nella tabella 4 è stato riportato il tropismo tissutale dei ceppi analizzati, registrato in sede autoptica o, nel caso dei tamponi, sulla base della valutazione dei dati riportati dal conferente.

DISCUSSIONE

In questo lavoro sono riportati i dati raccolti sul materiale diagnostico conferito nell'anno 2010 presso la Sezione Diagnostica di Forlì. I ceppi analizzati provengono da 16 regioni italiane, anche se con differente apporto numerico: la maggioranza dei ceppi analizzati provengono, infatti, dall'Emilia Romagna. La caratterizzazione molecolare di 213 ceppi di IBV ha permesso di rilevare 7 genotipi differenti circolanti sul territorio nazionale con percentuali variabili: 49.8% per il genotipo 793B, 29.6% per il QX, 12.2% per il Massachusetts, 5.6% per l'It02, 1,9% per il 624/I, e 0.5% per i genotipi B1648 e D274.

In accordo con quanto riportato precedentemente (6, 8), il genotipo 793B resta il genotipo a maggiore diffusione, essendo stato rilevato nel 49.8% dei campioni positivi analizzati, principalmente associato a forme respiratorie nel boiler. Bisogna però considerare che il metodo di analisi utilizzato non è in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo e conseguentemente, la percentuale riportata potrebbe essere una sovrastima dovuta all'inclusione nell'analisi di ceppi vaccinali attenuati vivi, largamente utilizzati nell'allevamento avicolo.

Il genotipo QX, segnalato in Europa a partire dal 2002 (3) e in Italia a partire dal 2005 (1), conferma l'aumento della sua diffusione, risultando il secondo genotipo per identificazione. La percentuale di identificazione (29.6%) è risultata, infatti, in netto aumento rispetto al 2009 (11.7%) (8) lo ritroviamo in 11 delle 16 regioni campionate, in particolare in pollastre ed ovaiole associato sia a forme respiratorie che riproduttive.

Il genotipo Massachusetts, molto diffuso in tutta Europa (9) è stato identificato nel 12.2% degli isolati analizzati, distribuito in maniera regolare tra le differenti tipologie produttive e maggiormente associato a forme respiratorie.

Il genotipo It02, isolato per la prima volta in Italia nel 1999, (2) nel corso dell'ultimo decennio era arrivato a notevole diffusione (30.5% tra il 2005 ed il 2007) (6). La sua identificazione nel 5.6% dei campioni positivi, conferma una diminuzione della circolazione di questo genotipo, in accordo con quanto riportato precedentemente (8). Il genotipo It02 è stato isolato prevalentemente da allevamenti di galline ovaiole, maggiormente associato a forme respiratorie.

Il genotipo 624/I, diffuso in Italia tra gli anni '60 e '90, aveva drasticamente diminuito la sua diffusione fino alla sua ultima registrazione nel 2004 (6). Ne registriamo l'identificazione in 3 allevamenti di broiler dell'Emilia Romagna ed 1 del Lazio, in tutti casi associato a forme respiratorie.

Il genotipo D274, molto diffuso negli anni '80 e all'inizio degli anni '90 in molti paesi dell'Europa occidentale e nei Paesi Bassi, era già stato identificato in Italia alla fine del 2009. Durante il 2010 è stato rilevato in Emilia Romagna in pollastre di 60 giorni di età con sindrome respiratoria.

Registriamo anche la ricomparsa del genotipo B1648, identificato all'inizio del 2010

in un allevamento nella provincia di Viterbo, in un gruppo di pollastre colpite, attorno ai 90 giorni di età, da una sindrome respiratoria.

Nonostante il tentativo di raccogliere più informazioni possibili riguardo lo stato vaccinale degli animali analizzati, in molti casi le informazioni non sono risultate complete. A questo proposito, siccome il metodo molecolare utilizzato non è in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo, i dati sono stati rielaborati escludendo dall'analisi tutti i ceppi con il 100% di omologia con i ceppi vaccinali più utilizzati (4/91, IB88, H120). Le percentuali di identificazione così rielaborate sono riportate in tabella 5. Circa il 50% dei ceppi di 793B identificati sono risultati del tutto omologhi al ceppo vaccinale, mentre nessun ceppo Massachusetts è risultato identico al ceppo H120. Bisogna però ricordare che le percentuali di identificazione così rielaborate possono essere considerate solamente una stima, in quanto il ceppo vaccinale ed il ceppo di campo 793B non differiscono affatto nella regione sequenziata.

E' molto interessante notare che, quando tutti i ceppi con omologia del 100% con i ceppi vaccinali inclusi nell'analisi vengono rimossi dall'elaborazione, il genotipo QX diventa quello maggiormente diffuso (40.1%), in accordo con quanto riportato in Germania, Olanda e Belgio negli anni 2002-2006 (9).

Nella figura 1 sono riportati gli alberi filogenetici costruiti con il metodo neighbour-joining che raccolgono le sequenze analizzate suddivise per genotipo, insieme ai ceppi di riferimento. L'analisi è stata effettuata utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011). Come emerge dall'analisi, i ceppi It02 e Massachusetts mostrano alta omologia di sequenza mentre due ceppi del genotipo QX (205423 e 220886) e due ceppi del genotipo 793B (30360 e 301182) si discostano notevolmente da tutti gli altri ceppi analizzati. Questi ceppi mostrano una omologia di sequenza con i ceppi di riferimento in tutti i casi minore del 92%. Mutazioni non silenti sono state rilevate nella regione ipervariabile del gene S1 sottoposta a sequenziamento, in tutti i 4 ceppi.

Indagini più approfondite sono attualmente in corso su questi isolati.

CONCLUSIONI

Sulla base dei dati raccolti nel corso del 2010 la prevalenza dei genotipi di IBV nel territorio appare diversificata. Sono stati identificati 7 diversi genotipi circolanti: 793B, QX, Massachusetts, It02, 624/I, B1648 e D274. Il genotipo 793B resta quello maggiormente diffuso, anche se il metodo di analisi utilizzato, non differenziando tra i ceppi vaccinali e quelli di campo potrebbe aver sovrastimato la diffusione di questo genotipo ampiamente utilizzato come vaccino vivo attenuato. Il genotipo QX si conferma in ampia diffusione, mentre si assiste alla sia pur sporadica ricomparsa dei genotipi 624/I e B1648.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Bochkov Y.A., Tosi G., Massi P., and Drygin V. (2007). Phylogenetic analysis of partial S1 and N genes sequences of infectious bronchitis viruses isolates

- from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Vir gen.* 35:65-71.
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. 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.
 6. Moreno A., Fallacara F., Tosi G., and Massi P. (2007). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della bronchite infettiva aviare isolati in Italia tra il 2005-2007. *Atti II Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria, ISTISAN congressi, Bologna 7-8 Giuno 2007.* -p 55.
 7. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
 8. Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Fiorentini L., Massi P. Caratterizzazione molecolare dei ceppi di virus della Bronchite Infettiva aviare isolati in Italia nel periodo 2007-2009 e nel primo bimestre del 2010. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviare (SIPA) 2010:XLIX Convegno annuale Forlì 29-30 Aprile 2010.* pag. 217-224.
 9. Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC.(2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* Jun;37(3):247-57.

Tabella 1. Distribuzione genotipica dei ceppi di IBV analizzati.

	Genotipo						
	793B	624/I	B1648	D274	It02	Massachusetts	QX
Numero isolati (%)	106 (49.8)	4 (1.9)	1 (0,5)	1 (0.5)	12 (5.6)	26 (12.2)	63 (29.6)

Tabella 2. Distribuzione geografica dei ceppi di IBV inclusi nell'analisi.

Regione	793B	QX	Massachusetts	It02	D274	B1648	624/I	N° isolati
Abruzzo	1	2						3
Calabria	3		4	1				8
Campania	3	2	1					6
Emilia Romagna	56	34	16	3	1		3	113
Friuli				1				1
Lazio	5	2				1	1	9
Lombardia	3	5		1				9
Marche	16	6	3	3				28
Molise	2							2
Piemonte		3	1					4
Puglia		1						1
Sicilia	1	1						2
Toscana	4	2						6
Trentino				1				1
Umbria	1							1
Veneto	11	5	1	2				19

Tabella 3. Distribuzione dei diversi genotipi suddivisi per tipologia produttiva.

Genotipo						
	793B (%)	QX (%)	Mass (%)	It02 (%)	D274 (%)	B1648 (%)
Boiler	44 (41.5)	12 (19.0)	8 (30.8)	1 (1.4)	/	4 (100) /
Pollastra	28 (26.4)	19 (30.2)	10 (38.5)	/	1 (100)	/ 1 (100)
Ovaiola	26 (24.5)	26 (41.3)	6 (23.1)	9 (75.0)	/	/ /
Riproduttori	8 (7.5)	6 (9.5)	2 (7.7)	2 (16.7)	/	/ /

Tabella 4. Tropismo tissutale dei genotipi.

	Genotipo					
	793B	QX	Massachusetts	It02	D274	624/I
Respiratorio	42	16	11	6	1	4
Renale	2	3	3	/	/	/
Riproduttore	1	6	1	/	/	/
Resp+ riprod	1	/	/	/	/	/
Resp+ renale	1	2	1	/	/	/

Tabella 5. Distribuzione dei diversi genotipi escludendo dall'analisi i ceppi con omologia del 100% con le sequenze vaccinali.

	Genotipo					
	793B	624/I	B1648	D274	It02	Massachusetts Qx
Numero isolati (%)	50 (31.8)	4 (2.5)	1 (0,6)	1 (0.6)	12 (7,6)	26 (15.4) 63 (40.1)

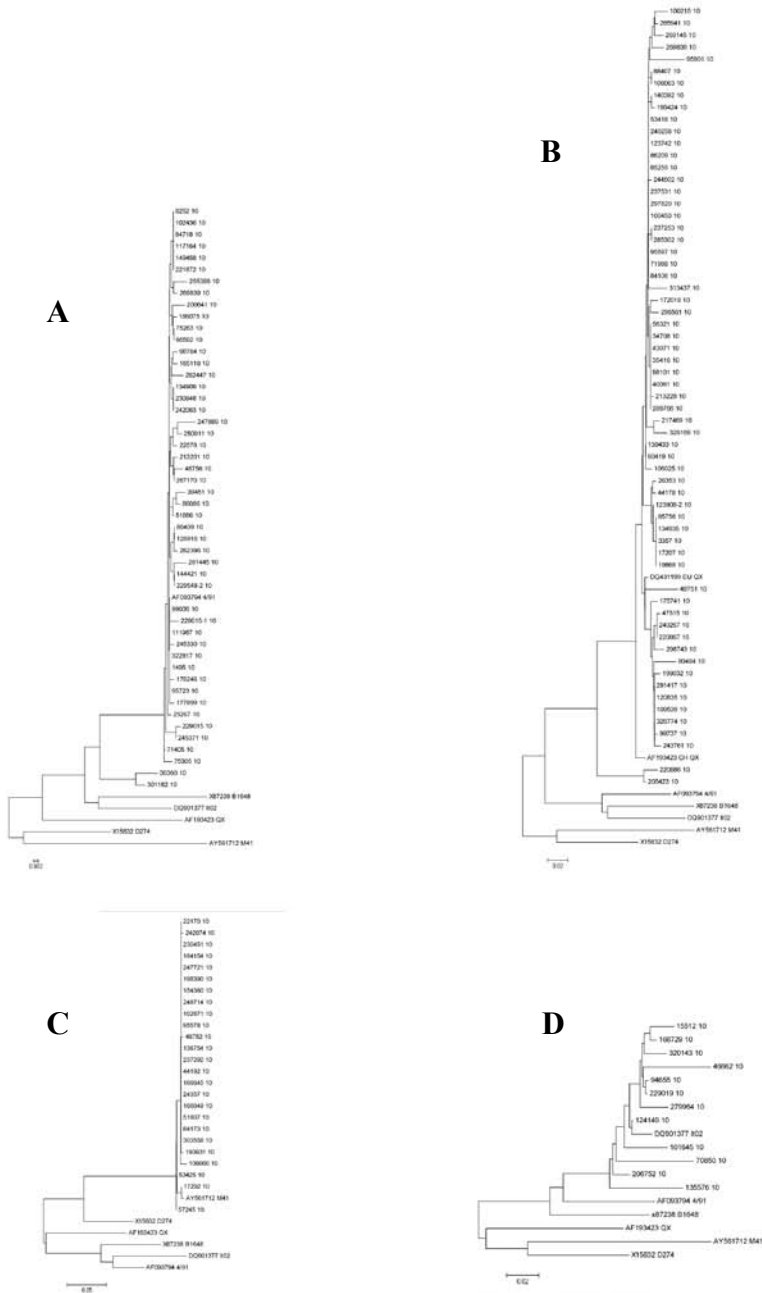


Figura 1. Alberi filogenetici costruiti analizzando le sequenze nucleotidiche parziali del gene S1 con il metodo neighbour-joining. **A.** genotipo 793B (sono stati esclusi dall'analisi tutti i ceppi 793b con omologia del 100% con il ceppo di riferimento AF093794); **B.** genotipo QX; **C.** genotipo It02; **D.** genotipo Massachusetts.

POSTER

CLOSTRIDIUM FIRSTTEST™: UN NUOVO STRUMENTO PER LA IDENTIFICAZIONE RAPIDA IN CAMPO DI CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN CAMPIONI FECALI DI BROILER

Pennelli D.¹, Deangeli D.², Saggiolato M.¹, Luisetto P.³, Bostvironnois C.⁴

¹Elanco Animal Health, Sesto Fiorentino, Firenze - ²Libero professionista, Este, Padova

³Libero professionista, Resana, Treviso - ⁴Elanco Animal Health, Bruxelles (Belgium)

Diversi studi condotti sulla fisiologia intestinale in gruppi di broiler indicano che la flora si stabilizza precocemente, nei primi 7-14 giorni di vita. Una buona flora intestinale, bilanciata e ben sviluppata, permette il mantenimento del benessere animale ed il raggiungimento di migliori *performance*, mentre una flora sbilanciata conduce a scarsa digestione dei nutrienti e conseguenti problemi sanitari.

Nel corso delle prime settimane di vita *Clostridium perfringens* (Cp) costituisce una larga parte della popolazione batterica intestinale; attorno ai 10-14 giorni questa popolazione si riduce per poi incrementare nuovamente verso i 28-30 giorni. Soggetti dalle buone *performance* tendono a ridurre il livello di Cp al di sotto di 10⁶ UFC/g di contenuto intestinale attorno ai 10-11 giorni. Tali ragioni permettono di considerare la valutazione della flora batterica intestinale a 10 giorni di età come un valido indicatore del corretto sviluppo dell'animale.

Il *Clostridium* FIRSTtest™ (Elanco Animal Health®) è uno strumento in grado di determinare rapidamente il livello di Cp in campioni fecali di broiler, permettendo al veterinario di ottenerne una precoce valutazione, minimizzando il possibile impatto successivo della sintomatologia clinica. Il test, basato su tecnica immunocromatografica, determina in campo il livello di Cp in pool di feci; per il completamento della prova sono necessari 20 minuti. Le innovative caratteristiche del test rapido consentono un notevole risparmio di tempo e costi rispetto alle normali procedure diagnostiche di laboratorio. Livelli intestinali prossimi al milione di Cp vengono indicati come “normali”, riportando ad una flora batterica controllata; livelli oltre i 10 milioni di Cp conducono ad un risultato “altamente positivo”.

Uno studio europeo, condotto su 119 allevamenti di broiler, ha dimostrato che nel 32% dei gruppi allevati i pool di feci esaminati per Cp a 10 giorni di età erano “normali”, mentre il 22% erano già “altamente positivi” ed il 46% “positivi”. Sono state evidenziate significative differenze nell'incremento di peso quotidiano (4 gr.) e nell'indice di conversione (8 punti), mettendo a confronto gruppi “normali” con gruppi “altamente positivi”; nel 40% dei gruppi “normali” non venivano riscontrati problemi nella gestione della lettiera, mentre soltanto il 10% delle lettiere in gruppi “altamente positivi” poteva considerarsi ancora perfettamente efficiente a 10 giorni di età.

Il mantenimento della integrità intestinale, attraverso un costante monitoraggio della integrità fisica e fisiologica della barriera intestinale, è uno dei fattori chiave nel moderno allevamento avicolo, per la prevenzione della patologia intestinale e dei rischi ad essa correlati. Poiché il *Clostridium* FIRSTtest™ è in grado di indicare in una fase precoce di allevamento se il gruppo potrà essere soggetto ad una sintomatologia enterica da Cp (test predittivo), si rende possibile un rapido intervento preventivo. Tale approccio può consentire di evitare cali di *performance*, mantenendo una buona integrità intestinale per tutto il ciclo produttivo.

INDICE DEGLI AUTORI

Accogli M., 168
 Agnoletti F., 76
 Andrighetto C., 146
 Argentieri M., 168

 Bano L., 66, 76
 Barbieri I., 193
 Battanolli G., 73, 79, 92, 95, 164
 Beato M.S., 92
 Bilato D., 73, 79, 92, 164
 Bolognesi P.G., 87
 Bonci M., 76
 Boniotti B., 193
 Borrelli L., 122
 Bostvironnois C., 189
 Brustolin M., 73, 79, 92, 95, 164

 Calabria M., 122
 Camarda A., 83, 98, 104
 Carminato A., 76
 Caroli A., 83
 Casadio M., 87
 Cassano D., 111
 Catania S., 63, 73, 79, 92, 95, 164
 Catelli E., 87, 174
 Cecchettin K., 174
 Cecchinato M., 174
 Cerquetti M., 168
 Cesca A., 76
 Circella E., 83, 98, 104
 Conzo G., 111

 De Guz D., 111
 De Luca Bossa L.M., 122
 Deangeli D., 189
 Di Paola G., 104
 Dipineto L., 122
 Dotto G., 111, 127
 Dottori M., 23
 Drigo I., 76

 Facco D., 73
 Fantinati P., 170
 Fiorentini L., 87, 141, 168, 170, 193
 Fioretti A., 122

 Gargiulo A., 122
 Gelmetti D., 141
 Giacomelli M., 127, 146
 Giammanco A., 168
 Gibelli L., 141
 Giovanardi D., 127, 160

 Giufrè M., 168
 Gobbo F., 73, 92, 95, 164
 Graziani C., 168
 Grilli E., 170
 Grilli G., 127

 Job L., 79, 92, 95, 164

 Lelli R., 41
 Lettini A., 168
 Listorti V., 174
 Lombardi A., 146
 Luisetto P., 189
 Lupini C., 174

 Manarolla G., 181
 Mani P., 33
 Martini M., 146
 Massi P., 60, 87, 141, 168, 170, 193
 Mazzacan E., 95
 Menna L.F., 122
 Mercier L., 184
 Morandini E., 160
 Moreno A., 59
 Muccioli F., 181
 Muñoz O., 174

 Pazzani C., 83
 Pecile P., 168
 Pennelli D., 104, 201
 Piccirillo A., 61, 111, 127, 146
 Piva A., 170
 Pugliese N., 83, 98

 Qualtieri K., 79, 95, 164

 Raglio A., 168
 Rampin T., 181
 Ranieri L., 184
 Russo T.P., 122

 Saggiorato M., 189
 Sensale M., 122
 Sironi G., 181
 Staffolani M., 168

 Taddei R., 87, 141, 168, 170, 189
 Tagliabue S., 104
 Terregino C., 174
 Todisco G., 98
 Tosi G., 66, 87, 141, 168, 170, 193
 Tugnoli B., 170

For poultry safety



stream ady - www.izom.it



Veterinary Biological Specialties

When your mission is prevention, you need effective defences against poultry diseases.

With its full range of high quality vaccines, **IZO** offers all the right solutions.

Mission accomplished.



Partner impegnati

La nostra competenza globale garantisce l'assistenza sul posto.

- Avian Vaccines
- Feed Additives
- Pharmaceutical Toll Production



 **Lohmann**
Animal Health

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 è segno del nostro successo. Questi risultati si ottengono attraverso soluzioni specifiche e servizi appropriati ai nostri clienti ovunque essi siano.

Prevention First

Lohmann Animal Health
Via Cadorna, 8/133
20090 Buccinasco (MI), Italy
Phone: + 39 02 45712447
e-mail: office.italy@lohmann.de
Fax: + 39 02 45704683
www.lohmann.de

MERIAL - Uno sguardo lungimirante...

Salmonella Enteritidis
&
Salmonella Typhimurium

chiedi consiglio al tuo Servizio Veterinario



...e le uova sono più sicure

NOI CRESCIAMO, VOI VINCETE...



Pfizer Poultry Health cresce e questo aiuta voi a vincere.

Pfizer Poultry Health offre oggi, come non mai, una vasta gamma di vaccini, un efficiente servizio al cliente, tecnologia, e supporto di esperti del settore. Contate su di noi come vostro fornitore di vaccini, specialità e apparecchiature di fiducia. Attraverso un servizio tecnico e di supporto al cliente competenti, Pfizer Poultry Health riunisce in tutto il mondo chi veramente si intende di salute e di produzione avicola. Il tutto supportato dal massimo impegno in ricerca e sviluppo.

COLLABORAZIONE, EXPERTISE, FIDUCIA

 **Poultry Health**



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 microsfele 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

the world
of chemifarma



chemifarma S.p.A.
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Il tuo partner in terapia
veterinaria e nutrizione



Terapia
Veterinaria



Nutrizione
Animale



Linea
Disinfettanti

www.chemifarma.it

Distributore esclusivo per l'Italia:

DOPHARMA
INTER NATIONAL
VETERINARY PHARMACEUTICALS

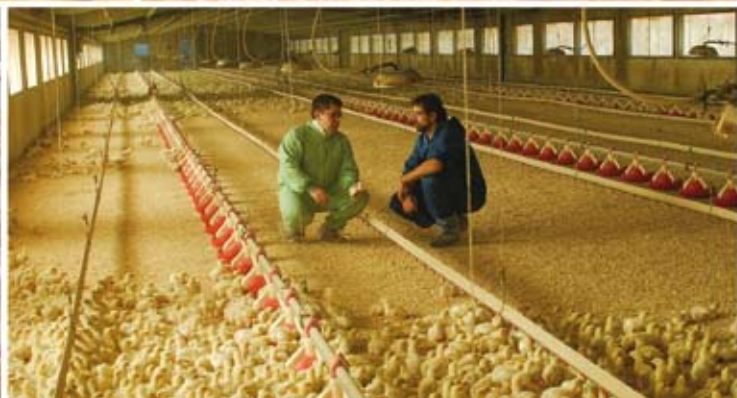
MAYMO

Via Don Eugenio Servadei, 16 - 47122 Forlì (FC) - Italy
Tel. +39 0543 796464 - Fax +39 0543 796479
e-mail: info@chemifarma.it - www.chemifarma.it



il Riferimento nella Prevenzione in Salute Animale

www.hipra.com



Finito di stampare
nel mese di marzo 2011
da La Ducale Srl - Parma