



# SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

## Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2014



## LIII Convegno Annuale

Salsomaggiore Terme (PR), 8-9 Maggio 2014

ATTI del LIII Convegno Annuale

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

In copertina: **Rooster**, Diane Whitehead - Oil on canvas  
[www.dianewhitehead.com](http://www.dianewhitehead.com)

**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2014**

**Salsomaggiore Terme (PR),  
8-9 Maggio 2014**

## INDICE

Prefazione..... pag. 19

### ATTI DEL LII CONVEGNO ANNUALE

*Forlì, 11-12 Aprile 2013*

### INCONTRO

*“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sulle principali malattie osservate fra il 2012 e il 2013”*

- *L. Gavazzi, E. Morandini*  
STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE ..... pag. 25
- *M. della Valentina, E. Alessandri* - STATO SANITARIO DEL TACCHINO DA  
CARNE IN ITALIA ..... pag. 35
- *E. Morandini, A. Ragazzini, S. Scolari, D. Giovanardi* - LE PRINCIPALI  
PROBLEMATICHE SANITARIE DELLE SPECIE “MINORI”..... pag. 49

### CONVEGNO

*“Evoluzione delle problematiche dell’allevamento moderno della gallina ovaioia”*

- *R. Pedicone* - LA SITUAZIONE DELL’ALLEVAMENTO DELLA GALLINA  
OVAIOIA IN ITALIA E IN EUROPA AD UN ANNO DALL’APPLICAZIONE  
DELLA DIRETTIVA 99/74/CE ..... pag. 59
- *M. Cassandro* - LA SELEZIONE GENETICA E LE NUOVE TIPOLOGIE DI  
ALLEVAMENTO DELLA GALLINA OVAIOIA ..... pag. 69
- *P. Massi, G. Tosi, L. Fiorentini, R. Taddei* - EVOLUZIONE DELLA  
PATOLOGIA DELLA GALLINA OVAIOIA NELLA NUOVA REALTA’ DI  
ALLEVAMENTO ..... pag. 79
- *V. Ferrante* - INDICATORI DI BENESSERE APPLICATI ALLE NUOVE  
TECNOLOGIE DI ALLEVAMENTO ..... pag. 93

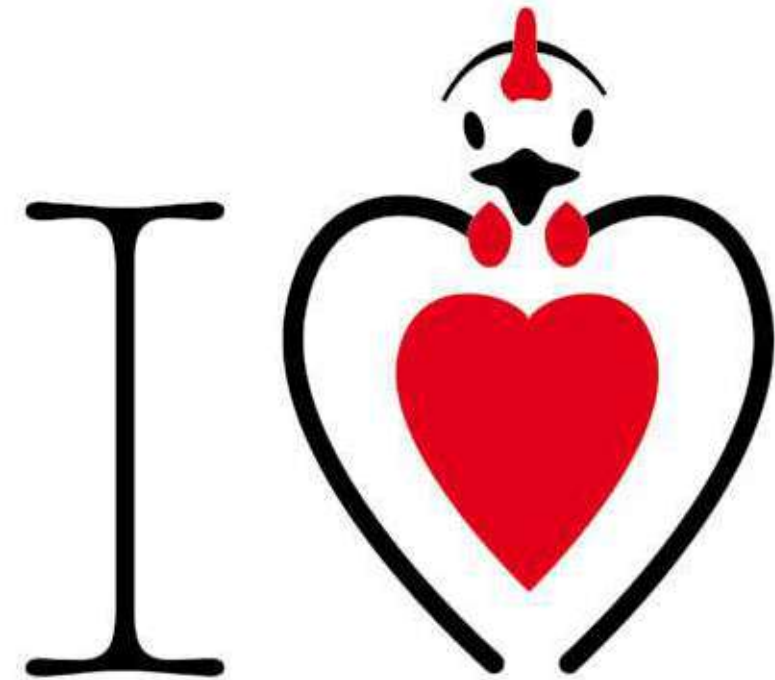
ATTI DEL LIII CONVEGNO ANNUALE  
Salsomaggiore Terme (PR), 8-9 Maggio 2014

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- Bano L., Berto G., Viel L., Drigo I., Bacchin C., Moret C., Puiatti C., Furlan G., Fracas V. Agnoletti F.  
CONTAMINAZIONI MICROBICHE DEL SACCO VITELLINO DI PULCINI DI UN GIORNO E VALUTAZIONE DELLA FARMACO SENSIBILITÀ DI CEPPI DI *ENTEROCOCCUS* SPP. ..... pag. 105
- Berto G., Agnoletti F., Drigo I., Tonon E., Vascellari M., Tarticchio G., Marcon B., Ferro T., Bano L.  
EPISODI DI COINFEZIONE CLOSTRIDICA IN OVAIOLE COMMERCIALI ..... pag. 110
- Caroli A., Pugliese N., Camarda A., Legretto M., Marino M., Circella E.  
FILOGENESI DI *CIRCOVIRUS* SULLA BASE DELLE SEQUENZE DEL GENOMA COMPLETO IDENTIFICATI IN SPECIE DIVERSE DI PAPPAGALLI (POSTER) ..... pag. 115
- Catania S., Santone C., Boscaro G., Sturaro A., Flaminio B., Gobbo F.  
STUDIO RETROSPETTIVO SULL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA IOWAE* NEL SETTORE TACCHINO DA CARNE ..... pag. 120
- Circella E., Caroli A., Legretto M., Pugliese N., Marino M., Camarda A.  
INFEZIONE DA *CIRCOVIRUS* NELLA GRU CORONATA (*BALEARICA EGULORUM*). CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEL VIRUS IDENTIFICATO (POSTER) ..... pag. 123
- Dipineto L., Borrelli L., Russo T.P., De Luca Bossa L.M., Caputo V., Gargiulo A., Barco L., Menna L.F., Fioretti A.  
ISOLAMENTO DI *SALMONELLA* INFANTIS IN RONDONI (*APUS APUS*) NELLA CITTÀ DI NAPOLI (POSTER) ..... pag. 128
- Dipineto L., De Luca Bossa L.M., Russo TP, Ciccarelli F., Borrelli L., Raia P., Santaniello A., Menna L.F., Fioretti A.  
PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER* SPP. IN RAPACI DIURNI E NOTTURNI ..... pag. 131
- Drigo I., Pascoletti S., Bacchin C., Berto G., Brunetta R., Agnoletti F., Viel L., Guolo A., Marcon B., Bano L.  
PFGE E MALDI TOF A CONFRONTO NELLO STUDIO DELLA SPONDILITE DA *ENTEROCOCCUS CECORUM* DEL BROILER..... pag. 134

- Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Casadio M., Massi P.  
APPROFONDIMENTI DIAGNOSTICI SU CASI DI PROVENTRICOLITE IN POLLI DA CARNE ..... pag. 138
- Fiorentini L., Tosi G., Milandri C., Usberti R., Rosetti M., Ricci G., Casadio M., Massi P.  
PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI* E *CAMPYLOBACTER LARI* IN BROILER REGOLARMENTE MACELLATI; PROFILO DI ANTITIBIOTICO RESISTENZA ..... pag. 145
- Massi P., Fiorentini L., Barbieri I., Casadio M., Tosi G.  
IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENOMICO DEI CEPPI DI VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO (IBDV) ISOLATI NEL POLLO DA CARNE IN ITALIA E IN PAESI ESTERI NEGLI ANNI 2012, 2013 E 2014 ..... pag. 155
- Massi P., Fiorentini L., Barbieri I., Giovannetti L., Casadio M., Tosi G.  
MONITORAGGIO DELLA COLONIZZAZIONE E PERSISTENZA DEL VACCINO VIVO ATTENUATO PER *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN RIPRODUTTORI PESANTI ..... pag. 168
- Massi P., Fiorentini L., Longoni C., Russo E., Casadio M., Tosi G.  
RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELL'INFEZIONE DA *SALMONELLA ENTERITIDIS* IN DUE GRUPPI DI GALLINE OVAIOLE DI 45 E 65 SETTIMANE DI VITA SOTTOPOSTE A DUE DIFFERENTI PROGRAMMI VACCINALI ..... pag. 172
- Moreno A., Ceruti R., Boniotti B., Gavazzi L., Fasoli P., Cordioli P.  
CIRCOLAZIONE DI UN NUOVO GENOTIPO DI VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA ..... pag. 177
- Moronato M.L., Baldasso E., Fincato A., Quattieri K., Flaminio B., Catania S.  
CIRCOLAZIONE DI DIFFERENTI GENOTIPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* NEL SETTORE AVICOLO INDUSTRIALE..... pag. 184
- Pampiglione G., Scaravelli D., Fiorentini L., Tosi G., Massi P.  
VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA IN LABORATORIO DI PRODOTTI A BASE DI BICARBONATO DI SODIO E SILICE PER LA LOTTA AL *DERMANYSSUS GALLINAE* (POSTER) ..... pag. 187
- Rodio S., Moronato M.L., Sattin E., Matucci A., Gobbo F., Catania S.  
*MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* NEL SETTORE AVICOLO: STUDIO DEI CEPPI CIRCOLANTI NEGLI ULTIMI TRE ANNI ..... pag. 189

- *Russo E., Longoni C., Pezzotti R., Fasoli P., Drigo M., Recordati C.*  
VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DEL WHITE STRIPING E DI POTENZIALI FATTORI PREDISponentI IN BROILER AL MACELLO .... **pag. 192**
  - *Scaravelli D., Massi P., Tosi G., Fiorentini L.*  
CASI INSOSPETTATI DI PATOLOGIE SCHELETRICHE: DISPLASIA DEL FEMORE IN *THRESKIORNIS AETHIOPICUS* E DI FRATTURA DEL FEMORE IN *ARA MACAO* (POSTER) ..... **pag. 196**
  - *Tosi G., Fiorentini L., Ceroni S., Casadio M., Compagnoni E., Massi P.*  
ANDAMENTO DELLA CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO (DON) E DA TOSSINA T-2 IN MANGIMI DESTINATO A SPECIE AVICOLE E DESCRIZIONE DI CASI CLINICI CORRELATI NEL POLLO DA CARNE ..... **pag. 198**
  - *Tosi G., Fiorentini L., Casadio M., Massi P.*  
ANDAMENTO DELLA SENSIBILITA' ANTIBIOTICA NEI CONFRONTI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE ALLEVATE E DA AVIFAUNA SELVATICA ..... **pag. 204**
- INDICE DEGLI AUTORI** ..... **pag. 217**



**HEALTHY  
CHICKENS**

Infectious bronchitis under control from the hatchery.

Il tuo partner  
in terapia veterinaria  
e nutrizione animale



Terapia  
Veterinaria



Nutrizione  
Animale



Linea  
Disinfettanti

Distributore esclusivo per l'Italia:



Visita il NUOVO sito web!

[www.chemifarma.it](http://www.chemifarma.it)

# Metti insieme il quadro completo

Resa superiore

Migliore uniformità

Costo per kg competitivo

Investimenti in  
GB & UE

Strutture  
pedigree  
europee

Servizio  
tecnico a livello  
mondiale

[cobb-vantress.com](http://cobb-vantress.com)

Prestazioni dei  
riproduttori  
superiori

Schiusa  
migliore fino  
al 4%

**Cobb**

Servire i nostri clienti attraverso l'uso di ricerche  
e tecnologie innovative per rendere la carne  
salubre ed economica per tutti

**L'azienda italiana  
che vola nel mondo.**



Da sempre conoscenza, applicazione e innovazione rappresentano i segni distintivi di Dox-al e stanno alla base di tutti i suoi brevetti e tecnologie riconosciute a livello internazionale. 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!



**Dox-al Italia S.p.A.**

Via Mascagni, 6 - 20884 Sulbiate (MB) Italy - Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400

**dox-al**

[doxal.com](http://doxal.com)

# THE ELANCO TRUSTED SOLUTIONS

**INTESTINAL  
PROTECTION  
SYSTEM**



**HEALTH  
TRACKING  
SYSTEM**



**ZERO DAY  
WITHDRAWAL  
SOLUTIONS**



**Elanco**

**Elanco Animal Health**

Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A.

Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)

Tel. 055 4257.031 - Fax 055 4257.068 - [www.elanco.it](http://www.elanco.it)

Trusted Solutions





# Tifosi Aviare

da FATRO la prevenzione



# in ACQUA di BEVANDA

CHIEDI INFORMAZIONI AL TUO VETERINARIO

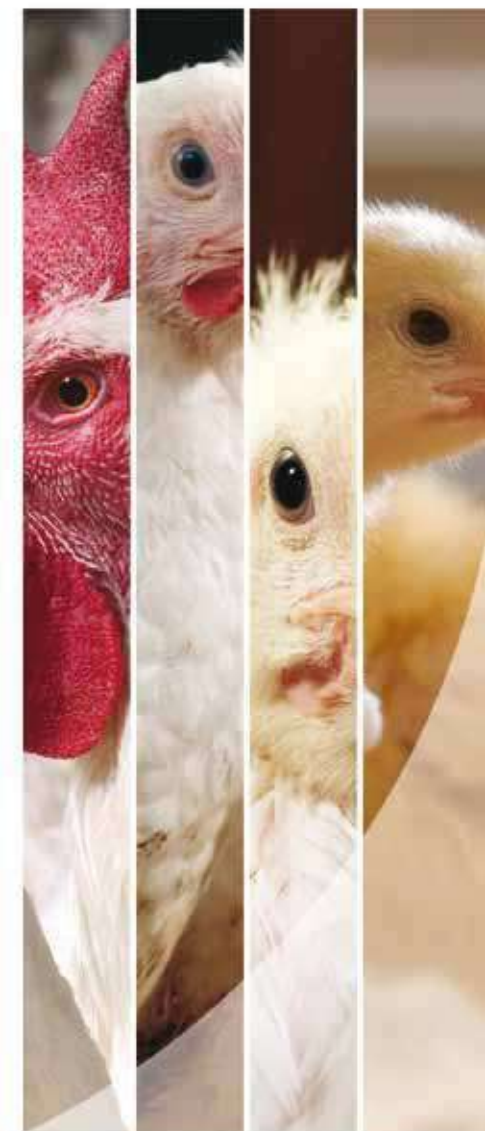


la salute animale per la salute dell'uomo

FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano Emilia (BO) - Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512714 - www.fatro.it - e-mail: info@fatro.it

HUVEPHARMA

# We add performance to your business

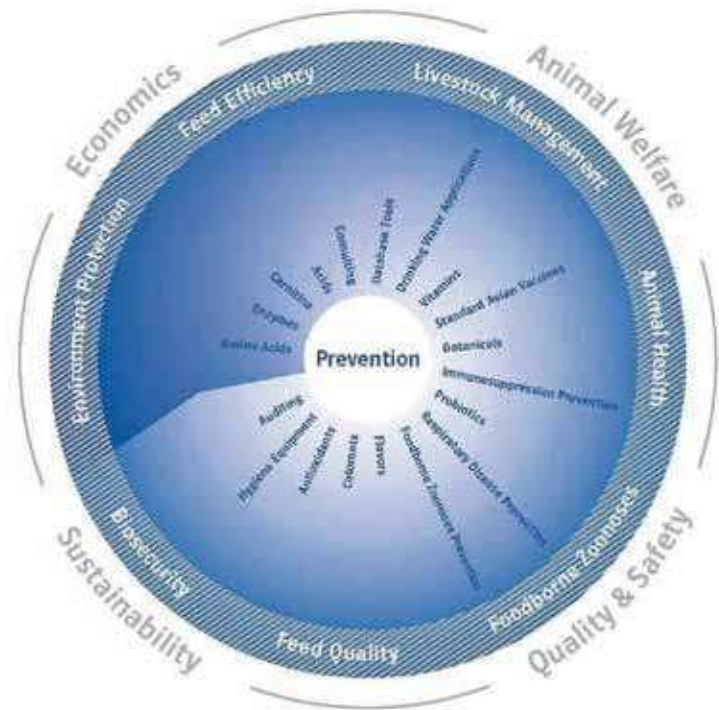


**Huvepharma AD**  
5th Floor, 3rd Nikolay Haytov Str.  
1113 Sofia, **Bulgaria**  
Tel.: +359 2 862-5331  
Fax: +359 2 862-5334  
e-mail: sales@huvepharma.com

**Huvepharma NV**  
Uitbreidingstraat 80  
2600 Antwerp, **Belgium**  
Tel.: +32 3 288 1849  
Fax: +32 3 289 7845  
e-mail: customerservice@huvepharma.com

**Contatti per l'Italia:**  
gabriele.festi@huvepharma.com  
paolo.mondini@huvepharma.com

- Vaccini per Avicoli
- Additivi per Alimentazione Animale



- ⇨ 80 anni di esperienza nella produzione animale.
- ⇨ Una gamma completa di prodotti che altre aziende non potrebbero avere.
- ⇨ Una visione completa della produzione degli animali destinati all'alimentazione umana.
- ⇨ Una competenza globale per affrontare le sfide del mercato, basandosi sul principio della Prevenzione.

... perché dobbiamo dimostrare che la produzione animale intensiva può benissimo essere in accordo con il benessere e la sostenibilità e che la nostra industria non solo sostiene tale idea, ma si pone anche come la sua forza trainante

**Lohmann Animal Health**  
 Via Cadorna, 8/133  
 20090 Buccinasco (MI), Italy  
 Phone: + 39 02 45712447  
 e-mail: [office.italy@lohmann.de](mailto:office.italy@lohmann.de)  
 Fax: + 39 02 45704683  
[www.lohmann.de](http://www.lohmann.de)

**Prevention First.**

MERIAL - Uno sguardo lungimirante...

# Salmonella Enteritidis & Salmonella Typhimurium

chiedi consiglio al tuo Servizio Veterinario



...e le uova sono più sicure



Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2014 sono realizzate grazie al contributo di:

- BAYER SANITA' ANIMALE
- CEVA SALUTE ANIMALE
- CHEMIFARMA
- COBB
- DOX AL ITALIA
- ELANCO ANIMAL HEALTH
- FATRO
- HUVEPHARMA
- LOHMANN ANIMAL HEALTH
- Merial ITALIA
- MSD ANIMAL HEALTH
- NOVARTIS ANIMAL HEALTH
- TRE I
- ZOETIS ITALIA

## PREFAZIONE

Ormai da alcuni anni la Società Italiana di Patologia Aviaria ha deciso di sviluppare, sia nell'ambito del convegno nazionale, sia in alcune tavole rotonde, l'importante argomento dell'uso responsabile dell'uso responsabile degli antimicrobici.

Questi incontri hanno riscosso sempre particolare interesse sia per la qualificata partecipazione di relatori nazionali e stranieri, sia per l'argomento di particolare attualità.

Anche quest'anno, grazie all'indicazione fornita dai soci nell'ambito dell'assemblea annuale, ci è sembrato interessante affrontare l'argomento delle strategie alternative e/o complementari all'uso responsabile degli antimicrobici. Esiste una vasta gamma di tecniche di gestione e di profilassi vaccinali che vengono utilizzati di routine al fine di impedire o ridurre la necessità di antimicrobici.

Questo argomento è molto vasto e non esauribile con un solo incontro ma, a nostro avviso, la presenza di relatori qualificati può portare chiarimenti e spunti per lo meno su alcuni aspetti importanti dell'allevamento che possono incidere favorevolmente sullo stato sanitario degli animali allevati.

Infatti, il miglioramento della salute animale rappresenta uno dei modi migliori per ridurre la necessità di trattamenti antimicrobici. Le buone pratiche di biosicurezza, una corretta alimentazione degli animali, un ambiente adeguato di allevamento, una gestione appropriata dei piani vaccinali e una genetica che ben si adatta alle nostre condizioni di allevamento sono già delle priorità che l'avicoltura nazionale ha ben presente e che vede questo comparto all'avanguardia nella zootecnia nazionale.

Anche questo incontro, al pari di quelli passati, è stato possibile grazie alla presenza costante e discreta di un gruppo di Aziende e Società sempre pronte a sponsorizzare i nostri eventi e che qui pubblicamente ringrazio.

Nella speranza che anche questo nostro convegno nazionale susciti interesse, colgo l'occasione per salutare tutti i soci.

Milano, 14 aprile 2014

*Dott. Guido Grilli*  
*Presidente SIPA*

ATTI DEL LII CONVEGNO ANNUALE

Forlì, 11-12 Aprile 2013

## **INCONTRO**

**“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sulle principali malattie osservate  
fra il 2012 e il 2013”**

**L. GAVAZZI e E. MORANDINI**  
**Stato sanitario del pollo da carne**

## STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE

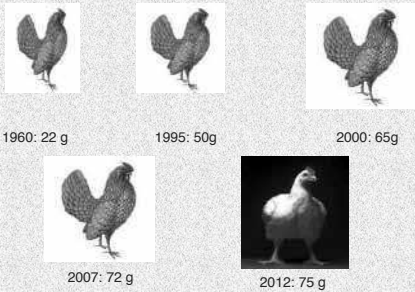
Gavazzi L., Morandini E.

FORLÌ 11 APRILE 2013

Società Italiana di Patologia Aviaria



## Sviluppo Genetico

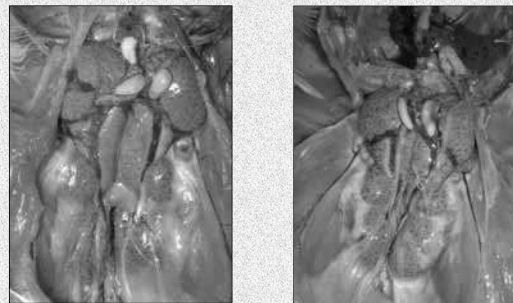


## IBV

- 103 ceppi da tamponi tracheali, tonsille cecali e reni
- Identificati con PCR e sequenziati
- Vaccinazione in incubatoio e richiamo in allevamento



## QX IBV

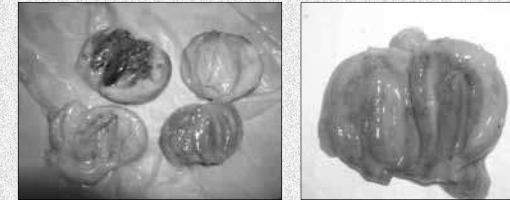


## IBDV

- Nessuna variante isolata
- Analizzate le Borse di Fabrizio
- ✓ 16, vv IBDV DV86
- ✓ 24, ceppi vaccinali
- Incubatoio: ricombinante o vaccino immunocomplesso
- Allevamento: vaccino vivo (intermedio)



## vvIBDV



## AMPV

- AMPV sottotipo B
- 45 episodi in broiler
- No vaccinazione

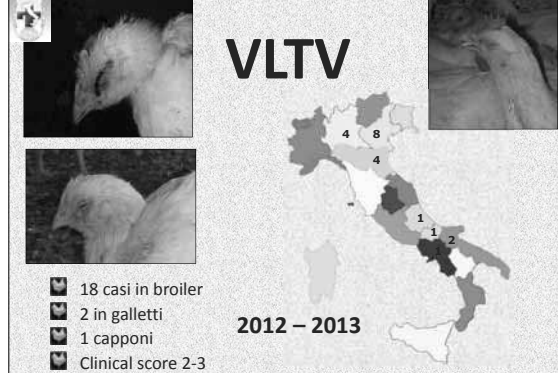


## VLTV



- Inizio degli episodi nel Nord Italia a partire dal 2007
- Pochi casi nel 2012-2013
- Principalmente tra i 30 – 50 giorni di età
- Dispnea, tosse, muco con sangue in trachea, edema e congestione della congiuntiva
- Implementazione della biosicurezza, attenzione agli spostamenti di persone, lettieri e animali morti
- Pulizia e disinfezione delle aziende
- Cooperazione tra i veterinari aziendali e l'IZLER

## VLTV



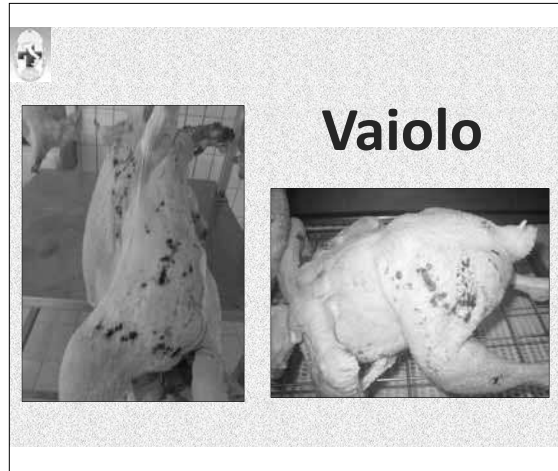
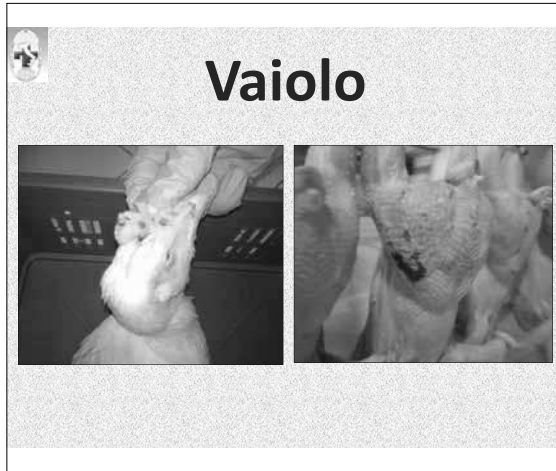
## NDV

- Circolazione di virus lentogeni
- Tacchini

## Vaiolo

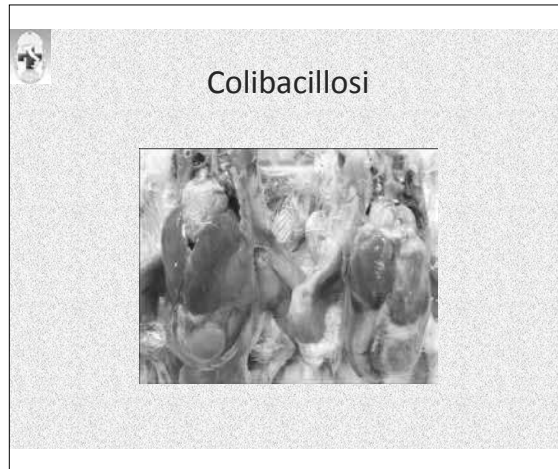






### MALATTIE BATTERICHE

- Reimerella e ORT assenti nel broiler a differenza del tacchino
- Il ceppo piu' frequentemente isolato E.Coli (APEC - Avian Pathogenic E.Coli) con diverse forme la piu' frequente la colisetticemia con lesioni fibrinose presente anche la forma articolare



### SPONDILITE DA ENTEROCOCCHI

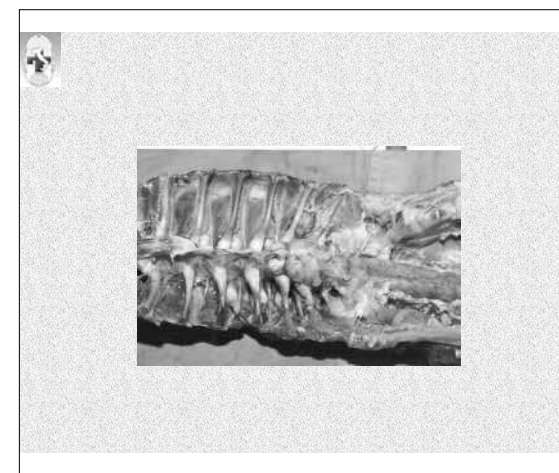
- Gram +
- Riguardano infezioni embrionali con mortalita' in uovo o infezioni del residuo del sacco vitellino nel primo giorno di vita, dovuta a cattiva gestione delle fasi della vita del pulcino ("poor chick quality")
- Negli ultimi anni segnalate osteomieliti a carico delle ossa lunghe e corpi vertebrali

- Osservata in polli di 4-5 settimane con isolamento dell'enterococcus cecorum da osteomieliti delle vertebre toraciche
- Sintomatologia cosiddetta "kinky-back" associata a spondilite da e.cecorum e' in aumento
- Difficolta' di deambulazione , decubito prolungato sui tarsi e sul coccige, difformita' di accrescimento del gruppo
- Alcuni si aiutano con le ali per la deambulazione

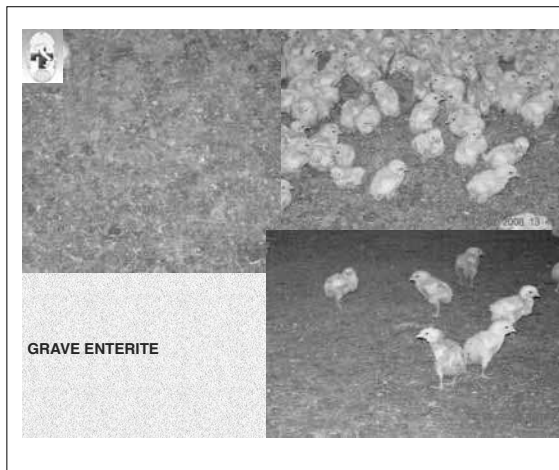
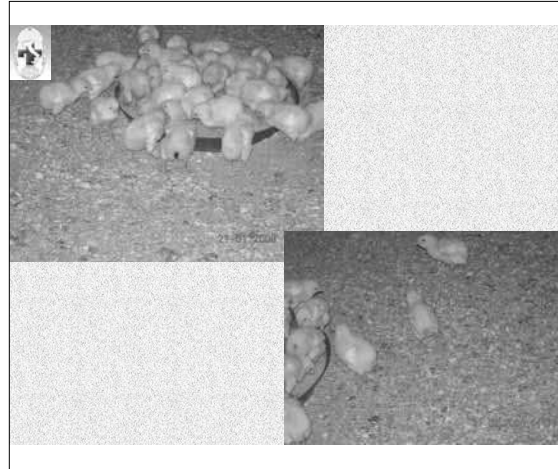
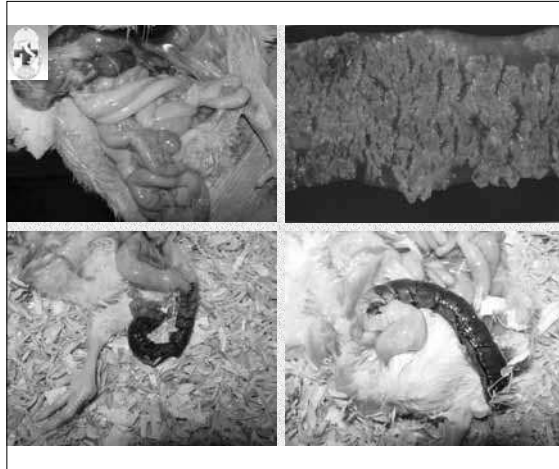


## Osteomielite

- Enterococcus cecorum
- E. Coli
- Staphylococcus



## ENTERITI



**MICOTOSSINE**

**MICOTOSSINE: GENERALITA'**

Metaboliti secondari di muffe  
(Aspergillus, Fusarium, Penicillium ecc.)

NON TUTTI I CEPPI SONO TOSSIGENI  
(A.flavus 10-15%)

LO STESSO CEPPO PUO' PRODURRE PIU' TOSSINE

LA STESSA TOSSINA PUO' ESSERE PRODOTTA DA MUFFE DIVERSE  
(es. Acido Ciclopiazonico da A.flavus e P.verrucosum)

**MICOTOSSINE: GENERALITA'**

Più di 300 note finora

Più stabili delle muffe che le producono

Contaminazione "a spot" nell'alimento

Frequenti le contaminazioni miste

**FATTORI CONDIZIONANTI**

1) MICOTOSSINE

- ✓ TIPO DI MICOTOSSINA
- ✓ DOSE
- ✓ PERIODO DI ASSUNZIONE

**FATTORI CONDIZIONANTI**

2) OSPITE

- ✓ SPECIE
- ✓ RAZZA, LINEA GENETICA
- ✓ ETA'
- ✓ STATO FISIOLGICO
- ✓ IMMUNODEPRESSIONE

**FATTORI CONDIZIONANTI**

3) ALIMENTO

- UMIDITA' > 13%
- T° > 24°C
- LIVELLO NUTRITIVO
- pH > 5
- Danni da insetti, parassiti ecc.

Questi fattori favoriscono lo sviluppo delle muffe  
NON NECESSARIAMENTE DELLE MICOTOSSINE



**LIVELLI DI TOSSICITA'**

Non esistono valori assoluti

Linee-guida (non hanno valore di legge)

FAO  
FDA  
Canadian Food Inspection Agency

**TRICOTECENI**

NON MACROCICLICI TIPO A: T2, HT2, DAS  
NON MACROCICLICI TIPO B: DON, NIVALENOLO

Prodotte da muffe del genere Fusarium

Inibitori sintesi di proteine e acidi nucleici

LINEE-GUIDA

FDA: 10 ppm DON  
CANADA: 5 ppm DON, 0.1 ppm HT2, 1 ppm DAS, 1 ppm T2



**TRICOTECENI**

100 ppb  
lesioni orali dopo 25 giorni

In vitro  
3.75 ppb: linfotossicità

**PROBLEMI**

Mancanza di limiti di riferimento per le micotossine più diffuse in campo avicolo

Spesso segni clinici e lesioni non sono accompagnate da livelli elevati di micotossine

**IPOTESI**

Errori nel campionamento

Errori del laboratorio

Presenza di micotossine sconosciute

Sinergismo tra micotossine diverse



**M. DELLA VALENTINA e  
E. ALESSANDRI**  
**Stato sanitario del tacchino da carne  
in Italia**



SIPA 2012

## Stato sanitario del tacchino da carne in ITALIA

A cura del  
Dr. Marco della Valentina -  
Dr. Enrico Alessandri

### Patologie prominenti

- INFLUENZA AVIARE (H<sub>9</sub>)
- H.E.V.
- T.R.T.
- N.D.V.
- CLOSTRIDIOSI
- E.COLI
- O.R.T.
- R. A.
- MYCOPLASMI

### Altre forme

- Istomoniasi
- Candidiasi
- Aspergillosi
- Malattie Metaboliche

### Influenza aviare



### SEGNI CLINICI

- Dipende dall'età' dell'animale.
- Se l'infezione avviene in momenti da 40 a 70 giorni di età' possiamo avere una mortalità' che raggiunge picchi dal 3% fino al 70%
- Se l'infezione colpisce il gruppo dagli 80 ai 120 giorni di età', possiamo avere una mortalità' che raggiunge dall'1% al 3-4%.
- Specificità' di sesso ?
- Secondo la nostra esperienza la femmina e' piu' sensibile



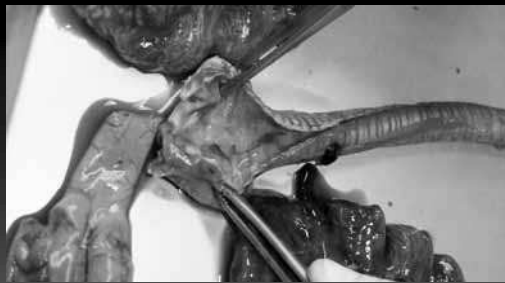
## Lesioni polmonari



## Addome infarcito di fibrina



## Tracheite catarrale



## Tracheite



## Tracheite



## Sospetta causa di morte

- Asfissia, per quantità abbondante di secreto in trachea, poi complicanze da forme intercorrenti batteriche (ORT, E. Coli, R. A)

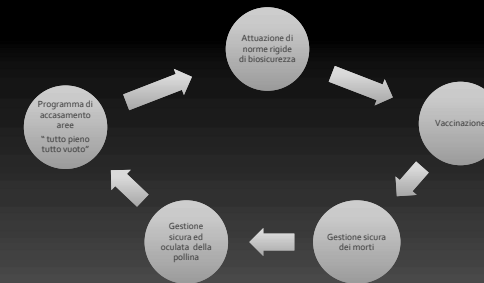
## Diagnosi

- La diagnosi clinica è dettata dalla riduzione di consumo di alimento, accompagnata da tosse forte
- Le lesioni anatomo-patologiche non sono patognomoniche e comunque sono sovrapponibili ad altre patologie respiratorie
- Tests p.c.r. e prelievi di sangue sono di grande aiuto per esprimere la certezza della diagnosi.

Che cosa possiamo fare per ridurre il rischio di diffusione ?



## Schema riassuntivo



## Momento di relax



## ENTERITE EMORRAGICA

- Sono stati spesi fiumi di parole e di soldi sulla descrizione, dei sintomi clinici, dei danni economici che provoca questa infezione virale, della profilassi vaccinale
- Qui riporto un dato che ci è stato dato gentilmente dalla sezione dello Zooprofilattico di Forlì:
- Effettuate, nel 2012, 50 ricerche per "adenovirus tipo 2" da tacchino; sono risultate positive per il **78%** su materiale proveniente da 6 Regioni Italiane (Veneto, Emilia Romagna, Piemonte, Umbria, Marche, Lazio): Provincie di PD, CN, FC, BO, RA, AN, PG, VT
- Quindi prevalenza molto alta di positività.





### HEV

- Sappiamo anche che in ITALIA non e' ammesso l'uso del vaccino vivo attenuato perche' non e' stato mai registrato e non sara' registrabile (registrazione Europea) (ceppo fagiano o ceppo Dommermut)
- La mortalita' media Nazionale Italiana sia del 13% nei maschi e del 8% nella femmina!!!
- La mortalita' media in Germania e' del 10% nei maschi e del 4% nelle femmine (qui si usa vaccino vivo per hev)

### HEV

- Quale miglior occasione, del convegno di Patologia Aviaria, per fare un appello ai rappresentanti delle Aziende Farmaceutiche e delle Aziende Produttrici di tacchini affinche' si facciano carico di presentare un dossier sul "Vaccino Vivo" per HEV?

### HEV

- Negli altri Paesi Europei ,che producono tacchini, e' ammesso l'uso del vaccino vivo attenuato.
- **NON VI PARE CHE SIA CONCORRENZA SLEALE !!!!!!!**

### HEV

- Sappiamo pure che, l'effetto immunodepressivo che provoca H.E.V., ci costringe a trattare con farmaci (aumento costo farmaco) in continuazione dall'eta'dei 40 giorni fino a 80.ed oltre
- Sappiamo anche che, la Comunita' Europea, tende a ridurre l'uso di antibiotici sugli animali da reddito per ridurre eventuali resistenze sull'uomo?
- E' noi poveri italiani come faremo ad assorbire questa direttiva?

### Rifacciamoci gli occhi



### Colibacillosi

- Patologie condizionate (stress ambientali, immunodepressione sia dettate da H.E.V. che da micotossine alimentari)
- Organi bersaglio: apparato respiratorio, con polmoniti e aerosacculiti
- Epatosplenomegalia, con necrosi dei lobi marginali epatici

### E.Coli-O.R.T.- R.A.



### Micoplasmosi

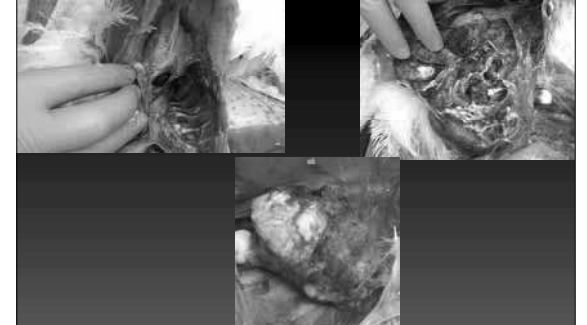
- Quest'anno, a differenza dell'anni scorsi, l'incidenza di infezioni da Mycoplasma s.p.p. e' sta notevolmente bassa
- Le misure di eradicazione applicate negli allevamenti di riproduzione hanno ridotto l'incidenza rispetto al passato
- La presenza di focolai e' comunque determinata da disattenzioni nella gestione delle biosicurezze, elevata densita' degli animali e promiscuita' con altre specie avicole

### Reimerella anatipestifer e ORT

- Sia l'una che l'altra con alta prevalenza
- Eta' degli isolati :da 40 a 80 giorni di vita
- Lesioni riscontrabili ai polmoni e sacchi aerei toraci e sintomi nervosi



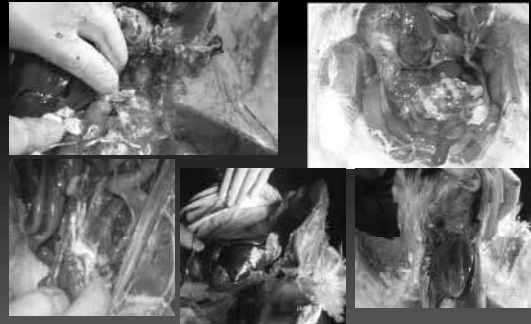
### Lesioni varie







Colibacillosi,  
R.A., O.r.t.



## Lesioni

- Le lesioni che abbiamo visto poc'anzi sono riferibili a:
- E.coli, r.anatipestifer e o.r.t.
- Le lesioni anatopatologiche non sono specifiche e quindi l'unico metodo per correlare l'agente eziologico e' dettato dall'isolamento (non sempre facile per ORT) batteriologico.
- I sintomi clinici (sintomi nervosi) un tempo ritenuti patognomonic per la Reimerella, oggi sono simili anche nelle colisetticemie

## Terapie

- da segnalare ceppi multiresistenti con resistenza ai piu' comune antibiotici
- Terapie lunghe (minimo 5 giorni in acqua di bevanda)

## ISTOMONIASI

Alcuni casi di Istomoniasi sono stati segnalati nel territorio nazionale

Nei casi di Ns conoscenza la mortalita' ha toccato l'80% .

La parassitosi non e' stata possibile trattarla

## Istomoniasi



## Istomoniasi

- Nella fase iniziale prima che si vengano a formare le lesioni tipiche "a occhio di pernice", qualche raro successo l'abbiamo ricavato con l'uso della aminosidina in acqua di bevanda associato a prodotti naturali-
- Fondamentale e' l'eliminazione della lettiera ed eseguire trattamenti specifici in ambiente contro gli ospiti intermedi (ascaridi, lumache anphithobius)
- Igiene dell'acqua e del mangime

## NDV ceppo lentogeni

- Capita spesso di isolare paramixovirus 1 ceppi lentogeni su dei tacchini con forme respiratorie, sintomi nervosi e mortalita'
- Questi isolamenti sono di origine .....vaccinale,(profilassi errate,diffusione sul territorio) o infezioni vere e proprie??

## MALATTIE METABOLICHE

- Nel tacchino da carne ci troviamo spesso ad assistere impotenti a delle lesioni articolari che creano dei danni irreparabili con notevoli perdite zoeconomiche

## E ora facciamo qualche cenno sulle malattie metaboliche





## Malattie metaboliche

- Nella lista delle patologie virali e batteriche che e' stata fatta, noi dobbiamo aggiungere tante altre cause che provocano mortalita'

## Malattie metaboliche

- Rottura aorta,discontroplesia,formazione di soggetti scarti,necrosi della testa del femore ,difficolta' alla deambulazione ,cuore tondo,diarrea continuativa e profusa ecc ecc

## Malattie metaboliche

- Ma se noi avessimo la possibilita' di poter fare  
:  
IL PROFILO METABOLICO DEL TACCHINO???

## Malattie metaboliche

- E la spiegazione per queste perdite?
- Colpa delle materie prime usate per la lettiera
- Colpa della ventilazione
- Colpa del troppo caldo o del troppo freddo
- Colpa delle lettiere che non vengono fresate
- Troppo caldo in pulcinaia ecc.ecc.

## MALATTIE METABOLICHE

- QUANTE RISPOSTE POTREMMO AVERE E DARE
- SULLE CAUSE DI MORTE SENZA UNA EZIOLOGIA PRECISA E QUANTI SOLDINI POTREMMO RISPARMIARE A LIVELLO DI FORMULAZIONE DI MANGIME !!!!

## Profili biochimici

- Non sarebbe quindi opportuno riuscire a studiare il profilo biochimico del tacchino?
- C'e comunque un problema che potremmo affrontare come risultato un nuovo ibrido pericolo

il risultato della biochimica "RENZUSCONI "



Marco ed Enrico vi ringraziamo per l'attenzione

**E. MORANDINI, A. RAGAZZINI,  
S. SCOLARI e D. GIOVANARDI**

**Le principali problematiche sanitarie  
delle specie “minori”**

## LII CONVEGNO ANNUALE SIPA

### Le principali problematiche sanitarie delle specie "minori"

Morandini E.- Ragazzini A.- Scolari S.- Giovanardi D.

Forlì Aprile 2013



## Qualche dato

- Prodotti di alta qualità
- Produzioni diffusa sul territorio
- Allevamenti (dati UNA) : 700
- Tot capi : 100.000.000
- Faraone
- Anatre e oche
- Capponi – galletti
- Fagiani - starne - quaglie



## Enterite della faraona

- Periodo invernale (nov-mar)
- Prime settimane di vita
- Più frequente dove si allevano solo faraone per vari cicli successivi
- Eziologia virale : Astrovirus, Enterolike etc...
- Multifattoriale : patogeni, management, stagione ecc...



## Sintomatologia

### Forma acuta

- Grave forma enterica
- Penne arruffate
- Anoressia
- Diarrea
- "Pinguini"
- Aspetto emaciato
- Mortalità variabile dal 2-10 %



## Lesioni

- Disidratazione
- Frequante presenza di lettiera nel gozzo e nello stomaco
- Fragilità ossea
- Contenuto intestinale liquido e gassoso
- Intestino trasparente e assottigliato



## Sintomatologia

### Forma Cronica

- Malassorbimento
- Ritardo della crescita
- Rachitismo (deviazioni sternali)
- Carenze secondarie
- Scarti
- Gruppo disomogeneo



## Candidiasi

### *Candida albicans*

- Colpisce l'animale giovane nelle prime settimane di vita
- Frequente dopo gravi forme di enterite
- Dopo ripetuti trattamenti con Ab



## Infezioni batteriche

### Colisetticemie

- Qualche caso associato a problemi respiratori
- 30-50 gg

### Riemerella A.

- Poco osservata
- Presenza di soggetti con sintomi nervosi in gruppi senza particolari problemi
- Sierosite fibrinosa
- Essudato nasale mucopurulento
- Meningite fibrinosa



## Diagnosi

- Conferma diagnostica
- PCR : positiva per MAPV
- Isolamento del virus dalle lesioni (Catelli et al.)
- Diagnosi differenziale con altre patologie respiratorie



## Pancreatite

- Malattia virale sostenuta da Adenovirus del gruppo 1
- Trasmissione verticale
- Animali giovani (2-4 sett)
- Mortalità: variabile dal 2-10 %
- Remissione dei sintomi in 7-10 giorni



## Faraone da riproduzione

### Sintomi

- Calo dei consumi
- Calo di produzione lieve
- Leggere diarrea
- Rare congiuntiviti
- Entrata in deposizione
- Remissione dei sintomi entro 4-6 gg
- Ripresa della produzione
- Uova : non osservate alterazioni particolari



## Faraone da riproduzione

### Diagnosi

- Clinica
- Tamponi orofaringei - tracheali
- PCR : negativa ?
- Esami sierologici : aumento titoli ac per MAPV

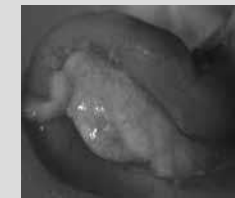
↓  
Sospetto MAPV



## Diagnosi

### Lesioni macroscopiche

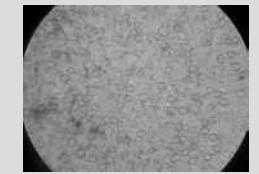
- Pancreas si presenta ingrossato, indurito e di colore giallastro
- Presenza di idropericardio e ascite
- Esami di laboratorio
- PCR positivo per Adn 1



## Coccidiosi

### *Eimerie Principali*

- *E. numidae* (intestinale)
- *E. grenieri* (cecale)
- Non si usano mangimi con coccidiostatici
- Terapeutici
- Non si sono osservati problemi particolari



## Faraone ingrasso

### Sintomi

- Forma respiratoria
- Rigonfiamento della testa
- Leggero aumento della mortalità
- Calo dei consumi
- Diminuzione della crescita



## Sintomatologia

### Fattori predisponenti

- Brusco calo della T°
- Riduzione al minimo della ventilazione
- Aumento della UR%
- Area geografica



## Anatra

- Produzione stimata in Italia 2.000.000 anno
- Anatra muta o di Barberia (Cairina moschata)
- Anatroccoli acquistati in francia



## Caso clinico

- 3-4 settimane leggera forma enterica con calo dei consumi
- Difficoltà a camminare
- Ripresa dopo 3-4 gg
- Verso i 60 gg perdita delle penne e delle piume
- Difficoltà di spiumatura al macello
- Mortalità nella norma



## Caso clinico

- Integrazione con complesso vit-oligoelementi, con scarsi risultati
- Lesioni anat-pat. : assenti
- Esami di laboratorio : negativi
- M.E. : negativa
- Vaccinati con vaccino bivalente a 10 gg



## Ipotesi diagnostica

- Infezione da Parvovirus precoce in animali parzialmente protetti dalla vaccinazione
- Interventi ciclo successivo**
- Aumento della dose vaccinale
  - Controllo qualità della vaccinazione



Scomparsa del problema



## Anatre

- Mortalità improvvisa in anatroccoli delle prime settimane di vita in gruppi in buono stato
- Soggetti con difficoltà alla deambulazione
- Presenza di forme nervose

## Lesioni

- Milza ingrossata e iperplastica
- Fegato edematoso, aumentato di volume e a volte marmorizzato
- Endocardite verrucosa (a cavolfiore)



## Capponi

- Vale in generale quanto osservato nei galletti
- Legge sul benessere
- Il miglioramento delle operazioni di castrazione ha limitato anche le infezioni post-operatorie osservate in passato
- Buona tenuta dei programmi di profilassi e prevenzione
- Non osservate forme virali



## Selvaggina

- Allevamento a ciclo continuo
- Forme enteriche virali complicate da infezioni batteriche : E.coli con mortalità in qualche caso elevata
- Candida
- Protozoi flagellati : trichomonas e histomonas



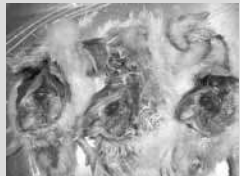
Grazie per l'attenzione

Emilio.Morandini@veronesi.it

## Diagnosi di laboratorio

### Esami di laboratorio

- Isolato Streptococcus bovis da
- Cervello
- Milza e fegato



## Galletti

- Problemi respiratori senza particolari problemi di mortalità
- Animali a lenta crescita
- In qualche caso complicati da E.coli

### M. Sinoviae

- Pigmentazione anomala
- Borse sternali
- Problemi articolari : sinoviti



## **CONVEGNO**

**“Evoluzione delle problematiche  
dell’allevamento moderno  
della gallina ovaioia”**

**R. PEDICONE**

**La situazione dell'allevamento della gallina  
ovaiola in Italia e in Europa ad un anno  
dall'applicazione della Direttiva 99/74/CE**



«La situazione dell'allevamento della gallina ovaiola in Italia e in Europa ad un anno dall'applicazione della Direttiva 99/74/CE»

Forlì – LII Convegno annuale SIPA  
Venerdì 12 aprile 2013

Rossella Pedicone

UNAITALIA - VIA TORINO 146-00184 ROMA

Avviso: a partire dal 1° luglio 2013 l'Italia ha raggiunto piena conformità

La produzione avicola in Italia

Nel 1950

- 50.000 t di carni
- 15 milioni di polli
- Pochi tacchini
- Molti piccioni
- 30 milioni di galline
- 4.000.000.000 di uova

Nel 2012

- 1.261.000 t di carni
- 525 milioni di polli
- 30 milioni di tacchini
- Altre specie
- 45 milioni di galline
- 12.602.000.000 di uova

L'11% della PLV agricola, il 33% della PLV zootecnica

Fonte UNA-UNAITALIA

una<sup>italia</sup> LE UOVA NEL MONDO  
(Produzioni 2012)

67 milioni di tonnellate

Circa 1.400 miliardi di uova prodotte da 5 miliardi e 435 milioni di galline



Fonte: Elaborazione UNA su dati FAO

una<sup>italia</sup> CONSUMI DI UOVA NEL MONDO

Nel mondo, ogni giorno si consumano 3,8 miliardi di uova per un totale annuo di 1.400 miliardi di pezzi/anno.

I più forti consumatori:

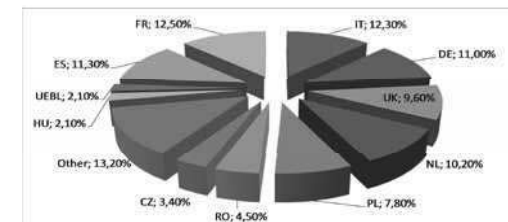
- **Messico** n° 350 pro capite annuo
- **Giappone** n° 330 pro capite annuo
- **Cina** n° 320 pro capite annuo e poi
- **USA** n° 248 pro capite annuo
- **UE** n° 229 pro capite annuo
- **Italia** n° 206 pro capite annuo



Fonte: Elaborazione UNA su dati FAO

una<sup>italia</sup> PRODUZIONE DI UOVA NELL'UE(27)

Nel 2011 326 mio capi in deposizione hanno prodotto circa 120 mld di uova (8,5% della prod. mond.)



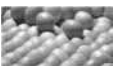
Fonte: Commissione europea – DG AGRI

una<sup>italia</sup> LE UOVA IN ITALIA  
(Produzione e consumo 2012)

n. 45 mio di capi in deposizione hanno prodotto:  
n. 12.602.000.000 = 793.900

Consumo annuo pro capite n. 206 uova, di cui:

- in guscio: 135 (66%)
- liquide, polveri (preparazioni): 71 (34%)



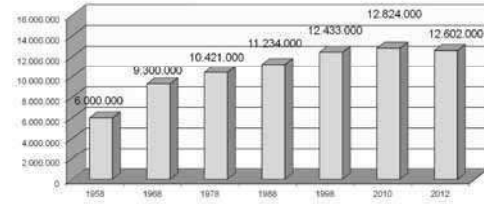
Fonte: UNAITALIA

una<sup>1</sup>italia  
La produzione di uova da consumo per regione (%)



Fonte: UNA

una<sup>1</sup>italia  
Italia - Evoluzione della produzione di uova da consumo (n° di pezzi x 000)

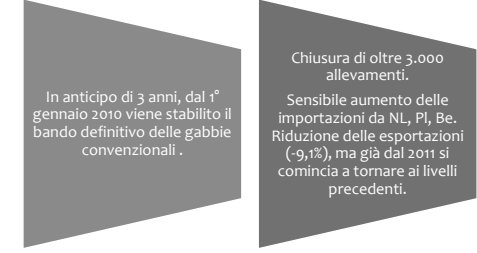


Fonte: UNA, UNAITALIA

Perché i tempi non sono stati rispettati

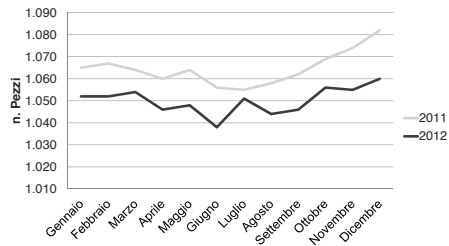
- Costi di adeguamento e costi di gestione
- Riduzione della capacità produttiva/sospensione produzione con mercato favorevole
- Ostacoli culturali verso il cambiamento
- Aspettativa di una rivisitazione della direttiva
- Certezza di proroga dei tempi (Comunicazione Commissione al P.E. e al Consiglio 8 gennaio 2008 invece che 1 gennaio 2005)

Nel frattempo in Germania (e non solo)



Fonte: AVITALIA

PRODUZIONE UOVA DA CONSUMO ITALIA  
ANNI 2011 - 2012 (milioni di pezzi)



Elaborazione UNAITALIA

I TEMPI STABILITI DALLA  
Dir. 74/1999/CE

- 1 gennaio 2003: i nuovi impianti adottano le nuove regole, le gabbie convenzionali assicurano 550 cm<sup>2</sup>
- 1 gennaio 2005: la Commissione presenta al Consiglio una relazione completa di valutazione impatto socio economico
- 1 gennaio 2007: i sistemi alternativi adottano i nuovi criteri
- 1 gennaio 2012: bando delle gabbie non arricchite (adeguamento vecchi impianti), 750 cm<sup>2</sup>

La Commissione intensifica gli avvertimenti sollecitando 10 Stati membri ad attuare il divieto relativo alle gabbie per galline ovaiole

In data odierna (21 giugno 2012) la Commissione europea ha inviato un parere motivato a dieci Stati membri. Il Belgio, la Grecia, la Spagna, la Francia, l'Italia, Cipro, l'Ungheria, i Paesi Bassi, la Polonia e il Portogallo consentono ancora l'uso di gabbie non modificate. L'invio di un parere motivato costituisce il passo successivo nella procedura prima del deferimento del caso alla Corte di giustizia dell'UE.

Comunicato stampa della Commissione

I passaggi significativi in Italia

- Dlgs 267/2003 ( modifica allegati nel 2004);
- Ottobre 2011 D.m. agricoltura (termine programma adeguamento 31-12-2014)

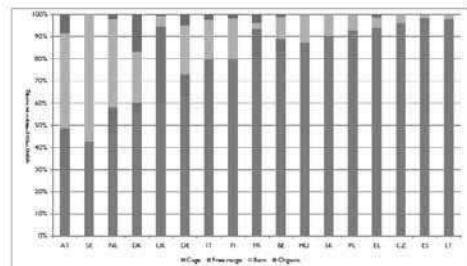
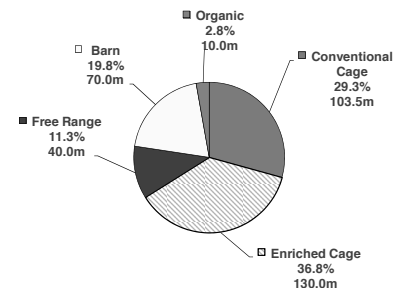


Figure 2.18: Percentage of layers kept in different housing systems in 17 EU Member States, 2008  
Source: Agri CEAS based on ITAVI from euro.com

na<sup>1</sup>italia  
IN EUROPA- Anno 2010  
Ripartizione del n. di galline ovaiole per sistema di produzione tot. 356,53 milioni



Fonte: Euve

FAC-SIMILE

Cronoprogramma investimenti previsti

Programma di ricoverazione	Anni				
	2011	2012	2013	2014	2015
Numero di gabbie da ricoverare					
Investimenti programmati (euro)					
Situazione a fine ricoverazione					
Numero di gabbie di cui:					
• a ricovero					
• a disposizione					
• a disposizione					
• a disposizione					

Fonte: AVITALIA

- Circ. min. salute 16-12-2011: termine sfoltimento 30-04-2012 (750cm<sup>2</sup>)
- Circ. min. salute nov. 2012 (11 mil non in regola): termine ultimo per adeguamento 30-06-2013, sospensione ispezione FVO
- Tentativi di modifica regime sanzionatorio (efficace, proporzionato e dissuasivo)

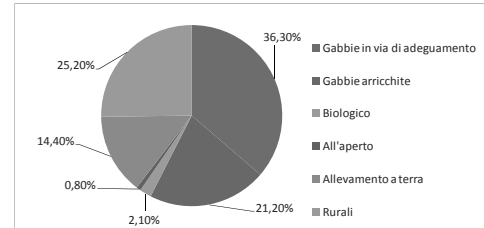
## Situazione attuale

- 4 Paesi non sono ancora in regola
- Un “gentlemen agreement” ha sospeso il deferimento alla Corte di Giustizia Ue
- 2 Paesi (fra cui l’IT) sono prossimi ad adeguamento (revoca n. registrazione all.)
- Entro ottobre 2013 la Commissione ritiene che tutta l’UE possa essere in regola

UNAITALIA 12 aprile 2013



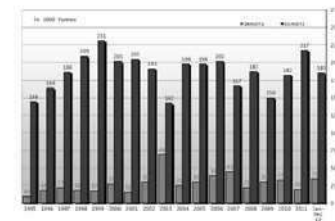
## ITALIA – PRODUZIONI PER SISTEMA DI ALLEVAMENTO GENNAIO 2012



Fonte: UNA



## EU Uova Import-Export (escluse le uova da covia)



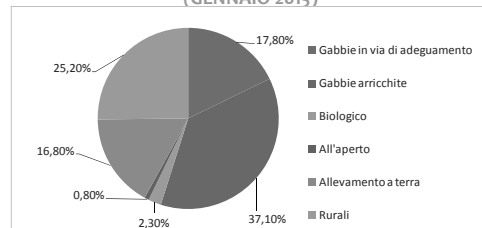
## EU Importazioni di Uova:

Dati commerciali (Comext – tonnes in uova equiv.) non incluse le uova da covia

	2009	2010	2011	2012	Importazioni	Variaz.
	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume
USA	4.253	22.403	21.147	20.791	20.791	- 234
Argentina	4.144	27.074	7.399	24.191	6.331	40,78
Mexico	2.000	5.191	1.893	6.274	508	2,74
Algeria	2.200	9.171	4.410	6.174	1.307	1,44
India	6.340	25.741	5.778	16.149	1.504	6,74
USA (cont.)	440	2.119	711	2.119	347	1,74
Canada	1.500	33	1.131	2.500	0	0,00
Brazil	40	6.231	67	6.274	0	0,00
Totale	21.127	111.850	36.410	112.103	25.213	22,49
in change					+ 224	+ 0,20



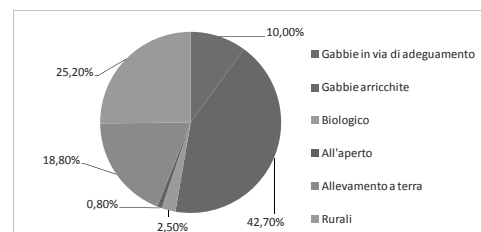
## ITALIA – PRODUZIONI PER SISTEMA DI ALLEVAMENTO (GENNAIO 2013)



Fonte: UNAITALIA

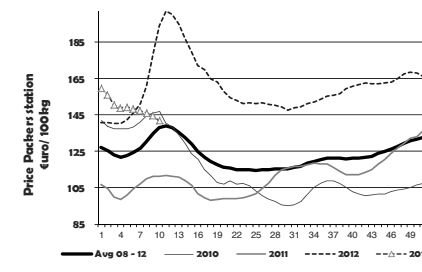


## ITALIA – PRODUZIONI PER SISTEMA DI ALLEVAMENTO (GIUGNO 2013 - Previsione)



Fonte: UNAITALIA

## Evolution of the weekly EU average price for Eggs for Consumption



Bruxelles, Advisory group 26-03-2013



## Vero maggior benessere

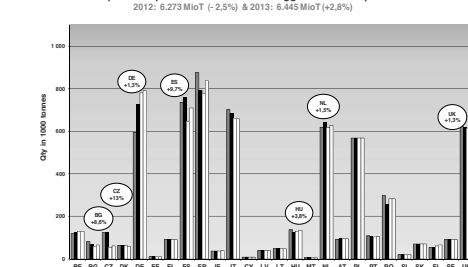
- Migliori condizioni microclimatiche, grazie alla rimodulazione degli spazi (largh. corridoi, h min. gabbie dal suolo e fra i piani).
- Maggiore impiumatura per termoregolazione.
- Maggiore resistenza a fratture ossee.
- Maggiore libertà di movimento
- Migliore stato sanitario
- Riduzione tasso mortalità e > produzione
- Capacità produttiva può risultare invariata

## Effetti?



- Costo degli investimenti e difficoltà accesso al credito: in tutta EU spesi 7 miliardi (in minima parte fondi SR)
- Riduzione di produzione nell'anno di adeguamento, ripresa nel successivo (ancora 5% di uova “illegali”)
- Dismissione impianti, specie di piccole dimensioni
- Riduzione competitività prodotto europeo (maggiori costi di produzione => import e< export)
- Ingresso uova da paesi terzi limitrofi (pericolo triangolazioni illecite);
- Non applicabile principio equivalenza: il benessere non può costituire una barriera commerciale

## Experts EU production forecast of Eggs for consumption



EU market situation for Eggs and Poultry. Advisory Group 26.03.2013

## Criticità

- A fronte di forte indebitamento per gli investimenti:
- Più alta % di uova declassate (specie nelle gabbie di prima generazione).
- Necessità di pollastre “allenate” per sistemi alternativi in voliera: qualità della pollastra ancora più importante
- Maggiori consumi alimentari a seguito > attività motoria
- Scelte adeguate per mantenere la capacità produttiva precedente

## Orientamento sul consumatore



Importanti gruppi, alcuni fin dal 2010, hanno scelto di avere sui propri scaffali o di utilizzare per la lavorazione dei propri prodotti solo uova da galline a terra o biologiche: Carrefour, Coop, Calvé, Autogrill, Giovanni Rana, Ikea, Barilla, etc.

una<sup>1</sup>italia

ALLEVAMENTO DI GALLINE IN GABBIA



una<sup>1</sup>italia

IN GABBIA ARRICCHITA



una<sup>1</sup>italia

SVEZZAMENTO POLLASTRE IN VOLIERA



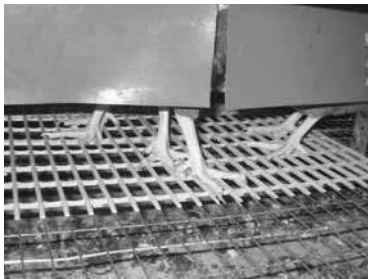
una<sup>1</sup>italia

IN VOLIERA



una<sup>1</sup>italia

IN GABBIA ARRICCHITA



una<sup>1</sup>italia

IN GABBIA ARRICCHITA



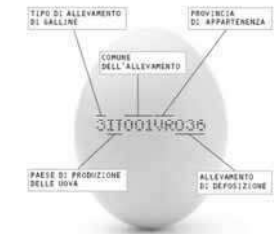
una<sup>1</sup>italia

ALLEVAMENTO BIOLOGICO/ ALL'APERTO



una<sup>1</sup>italia

IL CODICE SULL'UOVO



0= BIOLOGICO; 1= ALL'APERTO; 2=A TERRA; 3=IN GABBIA

una<sup>1</sup>italia

ALLEVAMENTO DI GALLINE A TERRA



una<sup>1</sup>italia

A TERRA (PARTICOLARE)



Grazie per l'attenzione



**M. CASSANDRO**  
**La selezione genetica**  
**e le nuove tipologie di allevamento**  
**della gallina ovaioia**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA **DAFNAE**  
 Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

**52° Convegno SIPA**  
 Evoluzione delle problematiche dell'allevamento moderno della gallina ovaioia

**La SELEZIONE GENETICA e le NUOVE TIPOLOGIE di ALLEVAMENTO della GALLINA OVAIOIA**

**Martino CASSANDRO**  
[martino.cassandro@unipd.it](mailto:martino.cassandro@unipd.it)

Forlì, 12 aprile 2013

**Programma**

**DAFNAE**  
 Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

- Premessa
- Selezione Genetica e Gen-omica..omiche
- Vecchi e Nuovi Obiettivi di Selezione
- Conclusioni

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA **Premessa: Esigenze future**

La popolazione mondiale è > 7 mld persone con un tasso di +80 milioni/anno di persone

La domanda di **uova** passerà da 65 mil. tonnellate nel 2005 a ≈75 mil. tonnellate nel 2015 con un incremento annuo di 1 mil. tonnellate

Necessiteranno ≈50 mil. di **ovaiole** ogni anno, assumendo un potenziale genetico di 20 kg di uova per ovaioia

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA **Premessa: Esigenze future**

L'attuale consumo di uova per persona e il relativo tasso i cambiamento dipende molto da:

- area geografica/continente
- paese entro continente
- tradizioni
- potere d'acquisto
- la disponibilità di altre fonti di cibo

Europa/Nord America ↔ Basso potenziale di crescita  
 Cina,India,Sud America ↔ Elevato potenziale di crescita

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA **Premessa: Risultati della Selezione**

I selezionatori hanno migliorato negli ultimi decenni:

- Produzione di uova
- Efficienza alimentare
- Qualità delle uova



Senza i **miglioramenti genetici** sin qui ottenuti, con i corrispondenti miglioramenti nei settori

- della nutrizione e alimentazione avicola,
- della patologie aviaria,
- nel *management*,



Il settore avicolo non avrebbe questo rilevante ruolo nel mercato globale del settore alimentare

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA **Premessa: Aspettative della Selezione**

I selezionatori dovranno nei prossimi decenni:

- Max la produz. di PRT di elevata qualità a basso costo
- Considerare nuove esigenze dell'industria avicola
- Rispettare i cambiamenti di abitudini e opinione pubblica dei consumatori

I selezionatori devono anticipare i cambiamenti e opportunità almeno 5 anni prima delle richieste di mercato con nuove genotipi.

**Quindi è molto importante la comunicazione tra SELEZIONATORI ↔ ATTORI FILIERA**


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Premessa: Aspettative dalla Selezione

Il business del settore avicolo è ormai globale e mercati diversi possono preferire diversi genotipi per produrre specifici prodotti in specifiche condizioni (GxE).

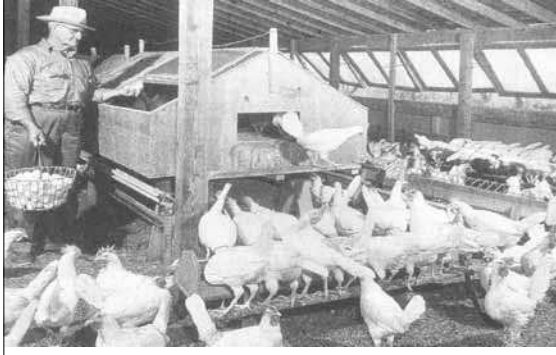
Tuttocì richiede un vasto **gene pools** da numerose **elite lines** le quali combinate possono **generare incroci** con varie e specifiche attitudini per i **vari e specifici mercati**

Mantenere e sviluppare nuove linee, testarle, selezionarle e riprodurle determina elevati costi fissi

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Premessa: Sistemi di Allevamento di ieri



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Premessa: Sistemi di Allevamento di ieri



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Sistemi di Allevamento di oggi



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Sistemi di Allevamento richiesti dall'EU (direttiva EU 99/74)



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Sistemi di Allevamento richiesti dall'EU


- Non abbiamo bisogno di reinventare nulla?
- Ciò che abbiamo acquisito non è da buttare
- Tuttavia, sapendo oggi molto di più sugli avicoli rispetto ad un passato re(moto)cente
- Possiamo e dobbiamo utilizzare queste info!

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Sistemi di Allevamento

Sistemi di allevamento per Ovaiole (direttiva EU 99/74)

1. Gabbia convenzionale (GC)
2. Gabbia Arricchita (arredata) (GA)
3. Piccola GA (< 15 ovaiole)
4. Grande GA (> 30 ovaiole)
5. Senza gabbia (SG) (es. Aviario/Voliera, all'Aperto, Biologico)

Sistemi GA



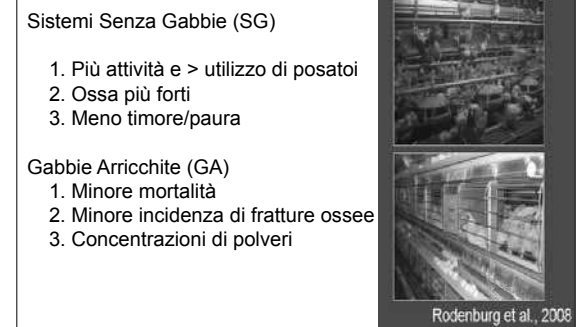
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Benessere & Sistemi di Allevamento

Sistemi Senza Gabbie (SG)

1. Più attività e > utilizzo di posatoi
2. Ossa più forti
3. Meno timore/paura

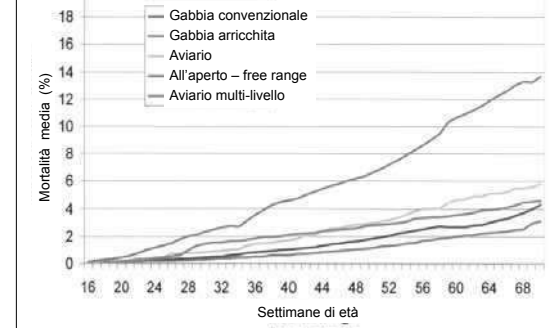
Gabbie Arricchite (GA)

1. Minore mortalità
2. Minore incidenza di fratture ossee
3. Concentrazioni di polveri



Rodenburg et al., 2008

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Sistemi di Allevamento e Mortalità



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Sistemi di Allevamento e Mortalità

Housing system	Germany	Denmark
Cage	8.8 (4.8 – 12.6)	6.2
Floor management	10.6 (3.0 – 13.8)	8.7
Aviary system	16.9 (4.2 – 31.8)	—
Free range	36.9 (15.1 – 50.1)	9.1
Organic free range	34.2 (15.4 – 50.0)	20.3

D.K. Flock and R. Preisinger

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Adattabilità nel futuro dell'Ovaiole

Conoscere i nuovi aspetti sul Comportamento e la Interazione Sociale delle ovaiole:

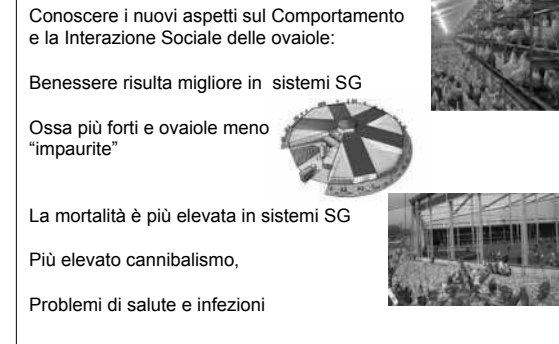
Benessere risulta migliore in sistemi SG

Ossa più forti e ovaiole meno "impaurite"

La mortalità è più elevata in sistemi SG

Più elevato cannibalismo,

Problemi di salute e infezioni



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Effetto di diverse Linee Commerciali di ovaiole allevate in Gabbia o a Terra

Strain	Mortality, %		Egg Number		Egg Weight		FCR		Ranking of IOFC	
	cage*	floor**	cage	floor	cage	floor	cage	floor	cage	floor
A	2.0	0.8	322	300	66.0	66.6	1.94	2.25	1	1
B	5.0	10.3	327	294	63.7	64.2	2.06	2.40	3	2
C	2.1	9.2	312	281	63.4	63.2	2.21	2.56	4	3
D	1.0	18.3	323	260	63.8	62.6	1.99	2.51	2	4
Average	2.5	9.7	321	284	64.2	64.2	2.05	2.43		

Linea A: funzionale in Cage e Floor  
Linea B e Linea C: più funzionali in Floor  
Linea D: più funzionale in Cage

D.K. Flock and R. Preisinger



**Comportamento in grandi nuclei**


**Difficile da gestire**  
(Aum. pica o feather pecking o plumofagia)

**Migliorare i metodi di selezione e di allevamento**

Obiettivo: creare un ottimale associazione tra gli avicoli e il loro ambiente fisico e sociale

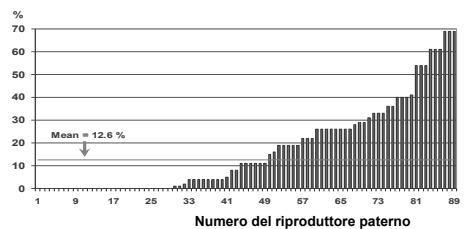
Focalizzare sulla performance del gruppo piuttosto che dell'individuo (Muir, 1996; Bijma et al. 2007)

Selezionare per la bassa mortalità entro gruppo (es. in 1ª generazione un -10% di mortalità)



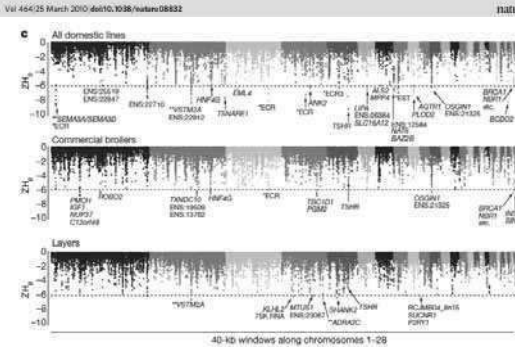
**Effetto genetico sulla Pica/Plumofagia**

Perdite per famiglia a causa della Pica/Plumofagia (non debeatati, elevata intensità luminosa)



D.K. Flock and R. Preisinger

**Manhattan plot del genoma di polli**



40-kb windows along chromosomes 1-28

**Obiettivi di selezione futuri per l'Ovaioia**

Obiettivi di selezione per una produzione sostenibile ed equa a lungo termine dovrebbero considerare caratteri di:

- 1 Produttività
- 2 Efficienza (FCR)
- 3 Redditività (IOFC)
- 4 Adattabilità a ≠ ambienti
- 5 Comportamento/Interazione sociale
- 6 Aspetti funzionali (fitness, longevità/resistenza)

Oggi (1-3) vs Domani (4-6)

**Premessa**

Disponiamo di:

1. Strumenti di Genetica/Genomica
2. Obiettivi di Selezione moderni
3. Integrazione tra competenze

Il tutto per migliorare oggi la

**ADATTABILITA' GENETICA delle OVAIOLE nei Sistemi di Allevamento Alternativi**



**Il Flusso dell'informazione genetica**

**Genetica Quantitativa**

**Genomica o Genetica Molecolare**

Proteomica: **PROTEINA** → **FENOTIPO**

Transcrittomica: **RNA** → **FENOTIPO**

**DNA** → **FENOTIPO**

Arrows indicate bidirectional flow between all components.

**Obiettivi di selezione futuri per l'Ovaioia**

Main trait group	Traits
Egg production level	Age first egg Hen-day egg production Persistence of production (rate of lay) Pauses (broodiness) Egg size/weight
Product quality	Color: Egg deformation Shell thickness, colour, texture, porosity and shape Inner: Albumen quality Blood spots Taste
Production efficiency	Mature body weight Feed consumption (level and type of feed) Female and male fertility Fecundity of eggs
Reproductive performance (broiler stock)	Growth rate/body weight Body conformation (carcass, breast meat, wing and leg yields)
Meat production characteristics	Meat yield/retention/edibility
Functional traits (broiler and commercial stock)	Disease resistance Leg strength Survival Feeding behaviour Maternal care Carcass yield Temperament (e.g. flightiness) Plumage colour standard for the breed
Others (e.g. type)	

A.F. Groen

**Comportamento in nidificazione**

New breeding goals in layers: W. Icken et al.

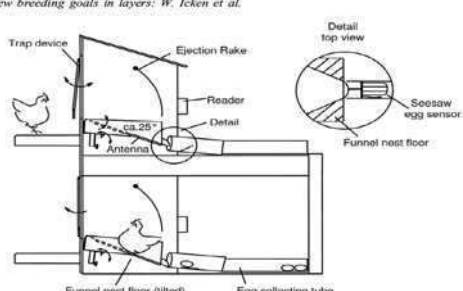


Figure 1. Weihenstephan Funnel Nest Box (FNB). World's Poultry Science Journal, Vol. 68, Sept

**La risposta alla selezione: RS**

$$RS = \frac{i * h * DSg}{N}$$

**RS =**  $\frac{\text{Intensità di selezione} * \text{Accuratezza} * \text{Variabilità genetica}}{\text{Intervallo generazionale}}$

i = dipende dal numero di animali controllati e scelti  
h = dipende dal numero e qualità dei dati per animale  
DSg = è assunta come una costante di razza (nel breve periodo)  
N = dipende dalla specie, dalle tecniche di allevamento e valutazione utilizzate

**POTENZIALE contributo della GENOMICA per la SELEZIONE**


La GENOMICA potenzialmente può aumentare il progresso genetico:

- AUMENTANDO l'accuratezza della valutazione
- AUMENTANDO l'intensità di selezione
- DIMINUENDO l'intervallo generazionale

E' bene, tuttavia, ricordare che la GENOMICA diminuisce di efficacia all'AUMENTARE dell' h<sup>2</sup>

**Comportamento in nidificazione**

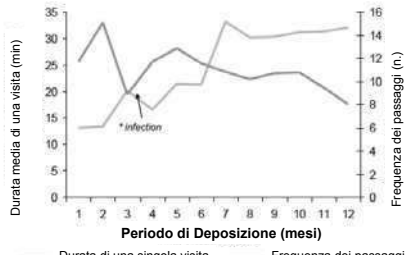
Entrata      Occupazione      Uscita



Carattere	brown layer	white layer
Tempo dell'ovodeposizione	08:00	09:45
Durata di presenza nel nido per l'ovideposizione	30 min	45 min
Durata di presenza nel nido senza ovodeporre	10 min	28 min

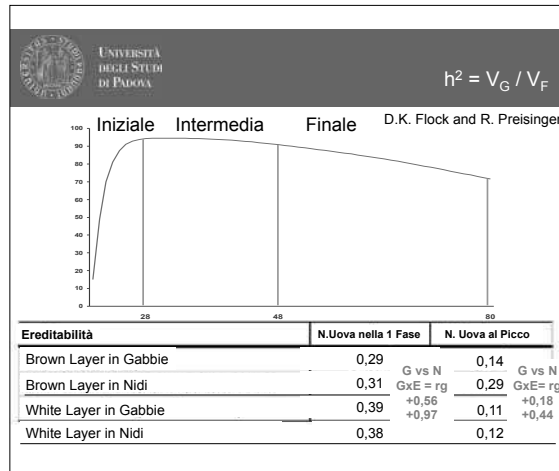
World's Poultry Science Journal, Vol. 68, Sept

**Comportamento in nidificazione**



D.K. Flock and R. Preisinger





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Esempi di Selezione per *Survival days*

Dal 1970: usando i nidi trappola si è selezionato per la produzione di uova a livello individuale.  
Qualità delle uova (colore e resistenza del guscio)

Oggi: più efficiente selezione per singola gabbia e gruppo di gabbie

**Table 2.** Predicted response to selection (days) for three selection methods; individual selection, group selection, and selection based on relatives, for the three layer lines of Table 3.

Selected lines:	W1	WB	WF
Individual selection	15.5	14.9	4.8
Group selection	21.7	22.0	7.7
Selection based on relatives*	17.4	17.6	6.1

Group size equals  $n = 4$ , selection intensity equals  $i = 1$ . \*Using a single group of four full sibs of the candidate.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Conclusioni

Grandi differenze tra sistemi di allevamento prestazioni, benessere, salute e igiene

Passaggio da GC a GA o SG:  
Aumenta la complessità dell'ambiente: positivo\*  
Aumenta il rischio di prestazione,  
Salute ed Igiene: negativo

\*Ippocampo = inserito nel sistema limbico, e svolge un ruolo importante nella memoria a lungo termine (Patzke et al., 2009)

- UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Conclusioni: Strategie selettive
- Sfruttare la varianza genetica tra e entro linee
  - Selezionare contro indesiderati comportamenti
  - Concentrarsi su caratteri di rilevanza mondiale
  - Sviluppo di un largo spettro di incroci per differenti mercati conoscendo la GxE
  - Creare *Gran Parents* per fabbisogni di specifici mercati

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Conclusioni: Keywords to keep in mind

La SELEZIONE per le NUOVE TIPOLOGIE di ALLEVAMENTO della GALLINA OVAIOLA deve considerare:

- Genomica/omiche e non solo genetica tradizionale
- Selezione per gruppo e non individuale
- Selezionare per aspetti interazione sociale e non solo efficienza produttiva
- Adattabilità Genetica delle ovaiole ai sistemi di allevamento alternativi (es. fitness, resistenza, aggressività, plumofagia, nesting behaviour)
- .....e altri nuovi fenotipi (es. sostenibilità ambientale, aspetti etici, biodiversità)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA DAFNAE Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

52° Convegno SIPA  
Evoluzione delle problematiche dell'allevamento moderno della gallina ovaiole  
La SELEZIONE GENETICA e le NUOVE TIPOLOGIE di ALLEVAMENTO della GALLINA OVAIOLA

**GRAZIE per l'ATTENZIONE**

e.....Welcome all'EPGS 2013 a VENEZIA

Forlì, 12 aprile 2013

Associazione Scientifica di Avicoltura  
Sezione Italiana della World's Poultry Science Association  
Assemblea dei soci, Forlì, 11 Aprile 2013

8<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Genetics  
25 - 27 September 2013  
Venice, ITALY

Chairman of the Organizing Committee: Prof. Martino Cassandro

More details are available at the Symposia website: <http://www.espg2013.com/>

Associazione Scientifica di Avicoltura  
Sezione Italiana della World's Poultry Science Association  
Assemblea dei soci, Forlì, 11 Aprile 2013

XV European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products  
XXI European Symposium on the Quality of Poultry Meat

**Bergamo, September 15-19, 2013**  
Chairman of the Organizing Committee and of Working Group 4: Prof. Margherita Rossi  
Chairman of the Scientific Committee: Dr. Massimiliano Petracci

More details are available at the Symposia website: <http://www.eggmeat2013.com/>

**P. MASSI, G. TOSI,  
L. FIORENTINI e R. TADDEI**

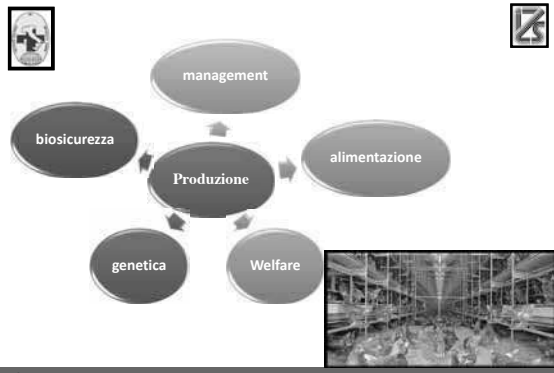
**Evoluzione della patologia della gallina ovaioia  
nella nuova realtà di allevamento**

**Evoluzione della patologia della gallina ovaia nella nuova realtà di allevamento**



Paola Massi  
Giovanni Tosi, Laura Fiorentini, Roberta Taddei  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Sezione di Forlì

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Welfare animale**

- **Convenzione di Strasburgo 10/03/1976**

↓

**Protezione degli animali negli allevamenti**

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Norme per protezione delle galline ovaiole**

- **Direttiva 1999/74/CE e Direttiva 2002/4/CE**

↓

**Decreto legislativo 29/07/2003 n.267**

- 1 gennaio 2012 → obbligo di utilizzo di gabbie modificate o sistemi alternativi

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Decreto legislativo 29/07/2003 n.267**

- Proprietario/detentore deve adottare misure adeguate per garantire il benessere dei propri animali e affinché non vengano loro provocati dolore, sofferenze o lesioni inutili

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Decreto legislativo 29/07/2003 n.267 allegato A**

- Ispezione: almeno 1 volta/dì
- Minimo rumore possibile
- Illuminazione sufficiente (1/3 giornata buio + penombra)
- Pulizia e disinfezione
- Eliminare deiezione-giornalmente galline morte
- Ispezionare tutti i piani

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Decreto legislativo 29/07/2003 n.267 allegato B (sistemi alternativi)**




- A terra
- In voliera
- All'aperto

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Decreto legislativo 29/07/2003 n.267 allegato D**


- Gabbie modificate



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Problematiche sanitarie**


- **Gabbie modificate**
- Maggior mortalità per cannibalismo e traumatismi
- Maggior numero di uova di scarto per rottura, incrinatura, o perché sporche per accumulo di uova ai lati delle gabbie



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Problematiche sanitarie**

- Sistemi alternativi
- **A terra**
- Peggioramento delle condizioni del plumaggio
- Maggiore mortalità per plumofagia e cannibalismo
- Produzione inferiore
- Occorrerebbe utilizzare le razze più rustiche
- Qualità ambiente peggiore per polvere e NH3 specialmente in inverno con irritazione per le vie aeree degli animali e dell'operatore



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Trasformazione degli allevamenti**

- Nel nostro Paese dal 2003 ad oggi è avvenuta ed è in essere una trasformazione degli allevamenti di ovaiole che si può considerare "epocale"

Molte le difficoltà :

- economiche
- burocratiche
- strutturali
- di programmazione di mercato
- gestionali



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Difficoltà gestionali**

- Nuove attrezzature con nuove gabbie, impianti di voliere, allevamenti a terra chiusi, a terra con apertura esterna, free-range, di tipo biologico
- linee genetiche adattate da anni alla gabbia tradizionale, a certi sistemi di ventilazione e di illuminazione e con alimentazione formulata per il sistema gabbia, nonché ad un sistema di raccolta delle deiezioni

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Problematiche sanitarie**

- Sistemi alternativi
- **Voliera**
- **gli animali** dovrebbero sviluppare ossa più robuste
- Necessitano uno svezzamento della pollastra in voliera, in quanto il pulcino deve imparare a muoversi in uno spazio tridimensionale
- Necessitano di un periodo di adattamento



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Problematiche sanitarie**

- Sistemi alternativi
- **Voliera/terra svantaggi**
- Aumento della manodopera
- Deposizione delle uova al difuori del nido
- Formazione di scarto
- **Cannibalismo** e plumofagia




52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Centro di referenza del benessere animale IZSLER-2003**

- Ministero della Salute
- Sede centrale a BS
- Sedi Regionali
- Referenti territoriali

↓

Corsi operativi per Veterinari Aziendali, Veterinari SSN, Veterinari IZS



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013


Corso giugno 2011-BS



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Problematiche sanitarie**

- Sistemi alternativi
- **All'aperto**
- Capannoni chiusi con collegamenti all'esterno del ricovero. All'esterno devono essere presenti tettoie per riparare dai predatori e intemperie
- Minor produzione
- Mortalità per predatori
- Rischio di contatto con fauna selvatica



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Problematiche sanitarie**

- Patologie infettive: Forme enteriche  
Forme respiratorie
- Patologie non infettive (traumatismi, emorragie interne, plumofagia, cannibalismo, morti da predatori)

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Esempio di patologia osteoporosi**

- Pollastre allevate a terra
- Zoppia pronunciata
- Fragilità ossea



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013


**Fratture ossee**

- Fratture ossee




52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Ascaridia galli**



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013


**Fratture ossee**



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**enterite**

- Enterite in galline a terra da disbatteriosi
- Duodenite e ileite catarrale



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Heterakis gallinarum**



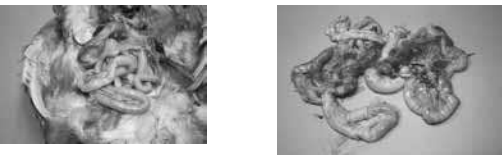
52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Railletina cesticillus**




52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Vari gradi di enterite**



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Duodenite e ileite emorragico-necrotica**



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

Prevalence (%) of gastrointestinal helminths in different poultry production systems

	Free range	Deep litter	Battery cage
<i>Ascaridia galli</i>	63.8	41.9	5
<i>Heterakis gallinarum</i>	72.5	19.4	1
<i>Capillaria obsignata</i>	53.6	51.6	-
<i>Cestodes</i>	-	-	3.3

(Permin A. et al., British Poultry Science 1999, 40:439-443)

**Istomoniasi (Histomonas meleagridis) allevamenti a terra**



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



*Aspergillus fumigatus*

*Candida albicans*



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



- Doppia problematica in voliera e a terra
- **Osteoporosi** con deviazione dello sternone
- **Melena** gastrica intestinale



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



Malattia di Marek



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



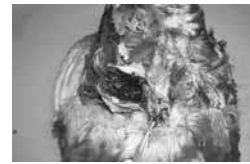
Diffusione maggiore nei soggetti a terra



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



Bronchite infettiva

- Nelle voliere e a terra molto più evidenti e precocemente i soggetti colpiti dalla forma riproduttiva da "false layer" da IB



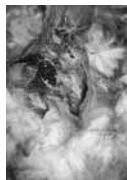
52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



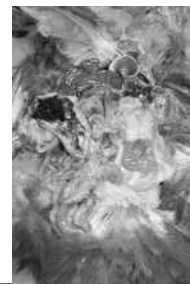
Mortalità involuzione ovarica



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



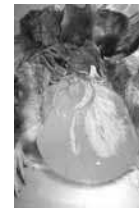
- Problema melena e micotossicosi è amplificato nell'allevamento **biologico**



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



Galline a terra di 23W con 86% deposizione  
Episodio 2013



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013




- Apex
- Maggiori problemi di rottura

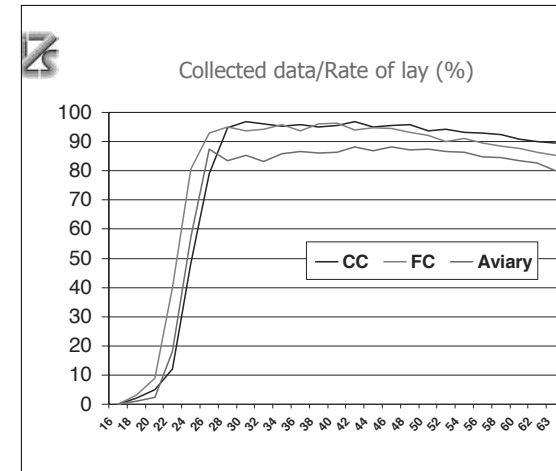
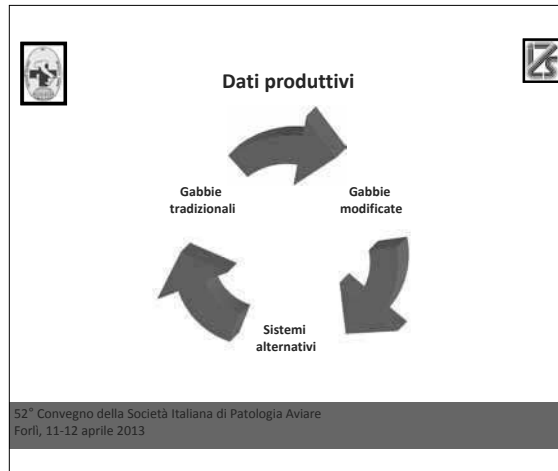


52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

**Colisetticemia**



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013




Collected data

	CC	FC	Aviary
Mortality (%) (dead+culled)	2.4	2.8	7.5
Downgraded eggs (%) (dirty+cracked)	1.3	2.3	2.8
FCR (Kg/kg egg mass)	2.0	2.08	2.29

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013

A comparative study between cage systems (conventional cages, furnished cages) and non-cage systems within the same layer farm



Giovanni Tosi  
giovanni.tosi@izsler.it  
Verona, 11th November 2011


Aim of the present study:  
To compare production performance and bacterial eggshell contamination in:

- Conventional cage system
- Furnished cages
- Non-cage system (aviary)

Within the same layer farm:

- Same management
- Same genotype (Lohmann Brown)
- Same pullet farm (beak trimming at 6-7 days of age)
- Same feed company
- Same period (august-october 2010)

The influence of housing system on the bacterial contamination of the eggshell



Bacterial shell contamination /Material and Methods

Samples were taken at 10-week intervals (20, 30, 40, 50, 60 weeks of age)

30 eggs from each housing system (in the same cages for cage-systems)

Only visually clean eggs were sampled

Eggs were picked up from the conveyor belt with sterile gloves and placed in sterile bags

Eggs were transported to the lab in cold storage

Materials and Methods / Housing

**Conventional cages**  
Hens housed: 17,600  
4-hen cages

**Furnished cages**  
Hens housed: 79,600  
Small group size: 10 hens/cage  
Cages of wire mesh with a floor slope of 7°  
15 cm perch per hen  
Nest box positioned at one end of the cage  
The bottom of the nest lined with plastic mesh  
Litter area positioned at the other end of the cage

Materials and Methods / Housing

**Aviary**  
Hens housed: 12,780  
Multi-tiered system with integrated nestboxes  
The house was divided into 3 pens  
Longitudinal ventilation  
Bottom of the nest lined with artificial turf  
Nest boxes without expulsion systems  
Cleaning of the nests twice a month  
Littered floor covered by a thin layer of sand  
Removal of dried manure twice a week

Bacterial shell contamination /Material and Methods

At the lab 100 ml of BPW was added to each bag  
The surface of each egg was gently rubbed by fingers through the bag for 1 min.

Trait	Medium	Incubation (Time, T°C)	Confirmatory test
Total aerobic microorganisms	PCA	3 days at 30°C	//
<i>Enterococcus</i> spp.	KAA	24h at 37°C	GRAM stain Catalase test
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBGA	24h at 37°C	Oxidase test Glucose fermentation

Bacterial shell contamination /Material and Methods

The eggshell surface (S) was calculated from the mean egg weight (W) using the following equation:

$$S = 4.68 W^{0.66}$$

(Bonnet Y. and Mongin P., Annals of Zootech, 1965, 14:311-317)

The counts of colony forming units (cfu) were transformed to logarithms and thereafter expressed as Log cfu/cm<sup>2</sup> of eggshell

### Bacterial shell contamination /Results

#### Total aerobic microorganisms

Housing system	Age (weeks)				
	20	30	40	50	60
CC	1.60	1.46	1.78	2.15	3.15
FC	2.18	2.70	2.09	2.90	4.02
Aviary	2.80	3.77	3.15	4.89	5.95

(Results expressed as log cfu/cm<sup>2</sup> of eggshell)



### Bacterial shell contamination /Results

#### Enterobacteriaceae

Housing system	Age (weeks)				
	20	30	40	50	60
CC	0.35	0.48	0.60	0.95	1.05
FC	0.50	0.98	0.90	1.39	2.30
Aviary	1.10	0.95	0.95	2.80	3.03

(Results expressed as log cfu/cm<sup>2</sup> of eggshell)



### Bacterial shell contamination /Results

#### Enterococcus spp.

Housing system	Age (weeks)				
	20	30	40	50	60
CC	0.80	0.45	0.10	0.35	1.05
FC	0.92	0.88	1.15	0.85	0.90
Aviary	1.05	0.80	0.95	1.39	1.10

(Results expressed as log cfu/cm<sup>2</sup> of eggshell)



### Bacterial shell contamination /Conclusions

An increase of bacterial counts at 50 and 60 weeks of age in all housing systems was noted

(age of the hens or seasonal influence?)

The contamination with total aerobic flora was highest in aviary  
+ 2.80 log vs. conventional cages  
+ 1.03 log vs. enriched cages

A similar result was observed for the count of *Enterobacteriaceae*

For the count of *Enterococcus* spp. this was not the case



### Bacterial shell contamination /Conclusions

The air contamination and the dust concentrations are generally highest in aviary systems

Nests with artificial turf may in fact be a hygienic benefit  
(an egg laid generally stays on it long enough for its shell to dry)

BUT

A proper management of the turf's hygiene is necessary

Further studies on the effects of housing systems on eggshell contamination are required

This may be important for **shelf life and safety of eggs and egg products**



### Costi di produzione

(esclusi raccolta e depositi uova e pollina)  
dati raccolti presso un'azienda

	Costo impianto/ capo in euro	Costo capannone/ capo per mq.	Costo imp.elettrico, montaggio e essicc.pollina/ capo	Costo totale/capo in euro
Gabbia modificata/ 100.000 capi	8	6,5	5,5	20 +IVA
Voliera/ 60.000 capi	12	12	7,5	31.5 +IVA
Terra tradizionale/ 12.000 capi	6	18	2,0	26 +IVA

52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



### conclusioni



- **Direttiva 1999/74/CE**
- **D.L. 29/07/2003 n.267**
- Settore avicolo deve fare uno sforzo continuativo per la buona applicazione al fine di migliorare il rapporto uomo-animale e con l'obiettivo di ridurre il gap produttivo fra allevamento tradizionale in gabbia ed i nuovi sistemi di produzione



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



Si ringraziano Produttori, tecnici e Veterinari Aziendali per i dati forniti  
E voi tutti per l'attenzione prestata!!!!



52° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria  
Forlì, 11-12 aprile 2013



**V. FERRANTE**

**Indicatori di benessere applicati alle nuove  
tecnologie di allevamento**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
E SANITÀ PUBBLICA

L'EVOLUZIONE DELLE PROBLEMATICHE DELL'ALLEVAMENTO  
MODERNO DELLA GALLINA OVAIOLA

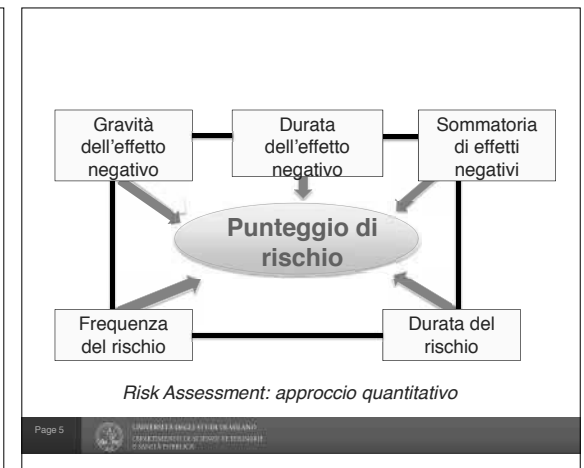
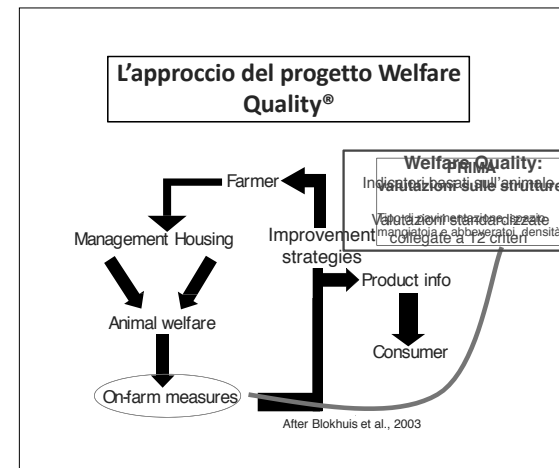
CONVEGNO SIPA  
FORLÌ 12 APRILE 2013

Indicatori di benessere applicati alle nuove  
tecnologie di allevamento

Valentina Ferrante

Welfare Quality®  
Science and society improving animal welfare

On farm assessment of animal welfare: the  
'Welfare Quality®'



Welfare Quality :  
Criteri "Animal-based"

1. Assenza di fame
2. Assenza di sete
3. Comfort nella zona di riposo
4. Comfort termico
5. Facilità di movimento
6. Assenza di lesioni
7. Assenza di malattie
8. Assenza di dolore indotto da pratiche di allevamento
9. Espressione del comportamento sociale
10. Espressione di altri comportamenti
11. Rapporto uomo-animale
12. Sensazioni positive

Welfare Quality®  
Assessment protocol for poultry  
Welfare Quality NEN

Housing Systems for Layers

a) Gabbie arricchite

b) A terra

c) free range; d) biologico

Primo e maggior rischio:  
Mancanza di corrispondenza  
tra sistema di allevamento  
utilizzato per la pollastra e il  
sistema utilizzato per la  
deposizione

**Ciascun sistema presenta vantaggi e svantaggi dal punto di vista del benessere**

LayWel project concludes

**I sistemi alternativi hanno in se il potenziale per mantenere e migliorare lo stato di benessere**

**MA**  
**Non sempre questo potenziale viene espresso nella pratica**

Tra le possibili cause le più importanti sono: il management, il clima, la genetica e l'interazione tra questi fattori

area ROSSA corrisponde ad un rischio elevato
Area ARANCIONE rischio variabile
Area VERDE rischio minimo
Rischi ancora non noti

Page 8

**Lesioni, patologie e dolore**

indicatore/ livello di rischio	Gabbie convenzionali			Gabbie arricchite		No-gabbia		Outdoor
	S	M	L	1 livello	Multi-livello	1 livello	Multi-livello	
<b>lesioni, patologie e dolore</b>								
mortalità (%)								
mortalità da plumofagia e cannibalismo con debeccaggio								
mortalità da plumofagia e cannibalismo senza debeccaggio								
Mortalità da patologie								
Necessità di tilizzo di farmaci								
predazione								

Page 9

Funded by the Better Training Initiative of the EU

**Lesioni, patologie e dolore**

indicatore/ livello di rischio	Gabbie arricchite			No-gabbia	
	S	M	L	1 liv.	Multi-livello
<b>lesioni, patologie e dolore</b>					
Endoparassitosi					
Parassiti esterni (red mite) antelminti/coccidiostatici					
Osteoporosi Resistenza delle ossa					
deformazione dello sterno					
Fratture nel periodo di deposizione					
Fratture durante il depopolamento					
Lesioni alle zampe					
Necessità di debeccaggio					

Page 12

**Parasites** Sherwin et al., 2010

Fattori di rischio:  
Scarso utilizzo e gestione del parchetto esterno (verminosi)

Strutture vecchie  
Luoghi difficilmente raggiungibili (mites)

**Conseguenze:**  
trattamenti, anemia, altre patologie, Aumento mortalità, cannibalismo

**Valutazione in campo delle condizioni dello sterno**

**Sul singolo animale**

Far scorrere 2 dita lungo lo sterno per valutare la presenza di deviazioni (laterali o dorso-ventrali) o la presenza di callosità

0: no deviazioni  
1: deviazioni

**PROBLEMI ALLE OSSA**

**FATTORI DI RISCHIO**

**DEFORMAZIONI DELLO STERNO**

- uso dei posatoi
- Tipo di posatoi (materiale, altezza, forma)
- Sistemazione dei posatoi (aviari)
- Assenza di posatoi nella fase pollastra

**Fratture da depopolamento**

- Elevata produttività
- Gabbie e struttura delle g da traspo.
- Modalità di depopolamento

**Conseguenze**  
Dolore aumento della mortalità

photo by Wilkins et al., 2012

**Punteggio della cresta**

Per ciascun animale viene valutata la cresta su entrambi i lati:

0 = nessuna evidenza di lesioni  
1 = < 3 beccate  
2 = 2-3 o più beccate

February 2007  
Deliverable 2.18.9, subtask 2.2.9.6  
EU Food-CT-2004-506508

**Valutazione in campo delle condizioni delle zampe**

**Sul singolo animale**

- Se necessario pulire la zampa
- Il punteggio è il seguente:

0: zampa intatta  
1: proliferazione dell'epitelio o pododermatite cronica  
2: Rigonfiamento (visibile anche dorsalmente)

### "Bumble Foot"

2

2

1

photos from Laywell Project, 2006

Fattori di rischio	
- Lettiera bagnata	
- Pasatoi sporchii	

Conseguenze	
- dolore	
- Difficoltà di movimento	

Category	White hens	Brown hens
FCs	4	2
NCs	11	4

LayWell database, 2006

2: gonfiore visibile dorsalmente:

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

### Lesioni cutanee

Sul singolo animale si guarda la regione del collo, dorso cloaca e si assegna il punteggio seguente:

0 nessuna lesione,  
1 1 beccata < 2 cm ≥ 3 beccate o graffi;  
2 almeno una lesione > 2 cm

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

### Punteggio delle condizioni del piumaggio in allevamento

Definire una misura che corrisponda a 5 cm (dita)

Controllare l'animale dalla testa alla cloaca con la sola esclusione della zona ventrale

0 = livrea perfetta  
1 = area deplumata < 5 cm  
2 = più aree deplumate ≥ 5 cm

14 1 2004

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

Funded by the Better Training for Safer Food

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

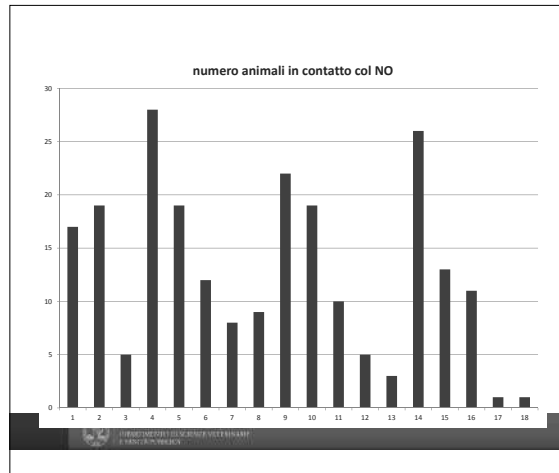
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE

### Sensazioni positive test dell'oggetto sconosciuto

Un tubo di plastica o una palla

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECCNICHE



## Relazione uomo-animale



Il TT è un test complesso che valuta la reazione degli animali nei confronti di una persona ferma.

## AVOIDANCE DISTANCE TEST



L'ADT valuta la reazione del singolo animale nei confronti di una persona che si avvicina.

- Il valutatore deve vestire di scuro e con scarpe coperte.
- Al fine di abituarli alla situazione nuova ed evitare reazioni di panico il valutatore deve bussare sulla porta del capannone prima di entrare e rimanere in piedi fermo per 5 minuti prima di iniziare il test.

### Avoidance distance test:

La distanza da cui si parte (1.5 mt) può essere facilmente valutata prendendo punti di riferimento fissi. quindi il valutatore comincia a camminare parallelamente al grigliato lungo questa distanza.



### Touch test:

- consiste nel tentare di toccare 21 animali, a questo scopo bisogna selezionare delle aree di lettiera in cui siano presenti almeno 3 animali
- il valutatore si avvicina lentamente al gruppo scelto (1 step/sec) e si china lentamente rimanendo fermo con le mani sulle ginocchia.

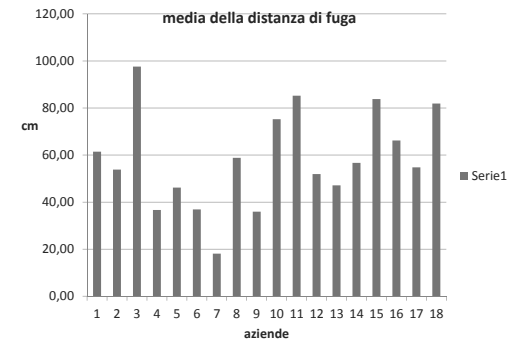
- Dopo essere rimasto in questa posizione per circa 10 secondi conta il numero di animali che sono ad una distanza corrispondente alla lunghezza del suo braccio (circa 70 cm)



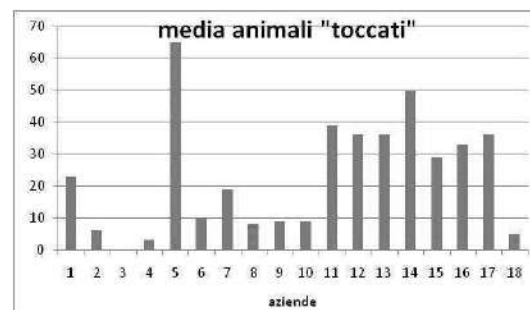
- Successivamente il valutatore cerca di toccare 3 animali tra quelli contati che siano raggiungibili e rivolti verso di lui.

### Measuring the avoidance distance:

Si può scegliere qualsiasi soggetto che sia appollaiato sul margine del grigliato e rivolto verso il valutatore ma bisogna testare gli animali lungo tutto il grigliato per ottenere una rappresentazione di tutto il gruppo.



- Il valutatore segnerà il numero di galline presenti e di quelle toccate.
- Il test viene ripetuto fino a che si è raggiunto il numero di 21 animali toccati o finché si sono effettuate 21 sessioni di test indipendentemente dal numero di soggetti toccati (min 0; max 63 in 21 trials).



### Vantaggi e svantaggi

#### Animal-based

Misurano il benessere direttamente sull'animale  
Occorrono definizioni accurate

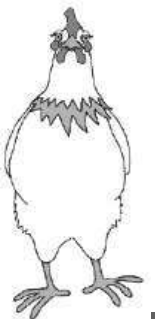
Necessita di training e precisione

necessità di tempo e personale

#### Resource-based

- Misurano il benessere indirettamente
- Misure più determinate
- Calibrazione più stabile
- - superficie numero di abbeveratoi etc,
- Progettazione della struttura
- Possibilità di valutazione delle strutture prima della realizzazione

Grazie per l'attenzione e.....non sparate sul pianista



LII CONVEGNO ANNUALE

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Salsomaggiore Terme (PR), 8-9 Maggio 2014

## **CONTAMINAZIONI MICROBICHE DEL SACCO VITELLINO DI PULCINI DI UN GIORNO E VALUTAZIONE DELLA FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI DI *ENTEROCOCCUS* SPP.**

Bano L., Berto G., Viel L., Drigo I., Bacchin C., Moret C., Puiatti C., Furlan G., Fracas V., Agnoletti F.

*Laboratorio di Batteriologia Speciale,  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Villorba, Treviso*

### **Summary**

Bacteriological examination of the yolk sac of 200 day-old chicks revealed a high rate of contamination, mainly due to *Enterococcus* spp. and *E. coli*.

*E. faecalis*, *E. gallinarum* and *E. faecium* have been the most frequently Enterococci species isolated and the drug susceptibility of 24 strains has been investigated by broth dilution method. The tested strains showed to be susceptible to penicillin and amoxicillin and resistant to tiamulin. Susceptibility to macrolides (tylosin, tilmicosin) resulted linked to the species. In addition, the majority of the strains resulted resistant to tetracycline.

### **INTRODUZIONE**

Durante il secondo giorno d'incubazione dell'uovo, il tuorlo viene circondato da membrane extraembrionali dando origine al sacco vitellino che, attraverso una ricca vascolarizzazione, provvederà a fornire all'embrione i nutrienti necessari al suo sviluppo. Due giorni prima della schiusa il sacco vitellino viene inglobato all'interno della cavità celomatica garantendo una riserva energetica per il pulcino nelle prime 24 ore di vita. La completa scomparsa del residuo del sacco vitellino avverrà tra il 10° e il 14° giorno di vita, a seconda di molteplici fattori tra i quali riveste una particolare importanza la rapidità con la quale il pulcino acquisisce la funzionalità digestiva (Buhr *et al.* 2006). Grazie alla ricchezza di sostanze nutritive, il contenuto del sacco vitellino rappresenta un ottimo substrato per lo sviluppo di molteplici specie microbiche. Tra queste le più comunemente isolate sono *Escherichia coli* ed *Enterococcus* spp. anche se non mancano segnalazioni di contaminazioni del sacco vitellino ad opera di *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Aspergillus* spp. (Buhr *et al.* 2006; Listera and Barrow, 2008; Cortes *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2004). L'infiammazione dell'ombelico prende il nome di "onfalite" ed è accompagnata da infezione microbica del sacco vitellino. L'onfalite è tra le prime cause di mortalità neonatale e viene solitamente contenuta attraverso la somministrazione di antibatterici nei primi giorni di vita del pulcino (Terregino *et al.* 2000; Listera and Barrow, 2008). Tra i fattori che possono influenzare un'incompleta cicatrizzazione ombelicale e l'insorgenza di onfalite si segnalano condizioni ambientali non ottimali quali bassa concentrazione atmosferica d'ossigeno, elevata temperatura e umidità relativa.

Sebbene siano molteplici le informazioni presenti in letteratura circa le specie microbiche contaminanti i sacchi vitellini di soggetti deceduti in seguito ad onfalite, sono scarsi i dati che riguardano lo stato di contaminazione microbica di questi

importanti residui embrionali in soggetti sani. Di seguito vengono riportati i risultati di un'indagine batteriologica eseguita su gruppi di pulcini sani di 1 giorno di vita, destinati alla produzione della carne, e i risultati di farmacosenibilità di ceppi di *Enterococcus* spp. isolati dal sacco vitellino.

## MATERIALI E METODI

### Campionamento

L'indagine ha riguardato 50 gruppi di pulcini di 1 giorno, selezionati casualmente tra quelli conferiti in vita al laboratorio diagnostico nel corso del 2013 per accertamenti sierologici e batteriologici routinari. I gruppi, omogenei per età, erano costituiti da 10 soggetti tra i quali sono stati individuati da 3 a 10 pulcini (mediamente 4) da sottoporre ad accertamenti batteriologici. In totale sono stati analizzati 200 soggetti. I gruppi di pulcini erano destinati ad allevamenti commerciali e provenivano da incubatoi diversi non segnalati al momento del conferimento. Non è noto se i soggetti fossero stati sottoposti a trattamenti farmacologici durante le consuete vaccinazioni "in ovo" o subito dopo la schiusa.

### Accertamenti batteriologici

I pulcini sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale e successivamente scuoiati per mettere in evidenza il sacco vitellino, attraverso il sottocute addominale. Il prelievo dal sacco vitellino è stato eseguito impiegando un tampone cotonato sterile, previa cauterizzazione dei tessuti incisi con bisturi sterile. Per l'esame colturale sono stati utilizzati i seguenti terreni: agar sangue esulina (ASE), eosin methylene blue agar (EMB), phenylethyl alcohol agar addizionato con 5% di sangue di montone (PEAA) e heart infusion broth (HIB). EMB e ASE sono stati posti a 37 °C in condizione di aerobiosi mentre una seconda piastra di ASE e i restanti terreni sono stati incubati a 37 °C in condizioni di microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>). I terreni sono stati ispezionati a 24 e 48 ore e, in caso di mancata crescita dopo 24 ore, si è proceduto all'esecuzione di un esame batteriologico indiretto a partire dall'HIB, secondo le stesse modalità sopra riportate. Colonie morfologicamente diverse sono state isolate ed identificate a livello di specie attraverso tecniche di batteriologia classica o MALDI TOF (Bruker Daltonics).

### Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

Dieci ceppi di *Enterococcus faecalis*, 10 di *Enterococcus gallinarum* e 4 di *Enterococcus faecium* isolati da sacchi vitellini, sono stati sottoposti a test di farmacosenibilità attraverso il metodo della determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), eseguita con diluizioni scalari del principio attivo in brodo, come previsto per *Enterococcus* spp. nei manuali internazionali di riferimento (CLSI, 2013). I principi attivi impiegati nel test sono stati amoxicillina, tilosina, tiamulina, tilmicosina, penicillina e ossitetraciclina. Per *E. faecalis* e *E. galinarum* sono stati calcolati i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>.

## RISULTATI

### Esame batteriologico

Quarantuno dei 50 gruppi testati (82%) comprendevano almeno un soggetto risultato positivo all'esame batteriologico. In totale 109/200 (54,5%) soggetti hanno presentato contaminazione del sacco vitellino da parte di 1 o più specie batteriche.

In particolare 5 soggetti sono risultati contaminati simultaneamente da 3 specie batteriche diverse e 36 soggetti da 2 specie. In totale sono stati isolati 156 ceppi batterici e 73 di questi appartenevano al genere *Enterococcus* (58 *E. faecalis*, 11 *E. gallinarum*, 4 *E. faecium*). *Escherichia coli* è risultata la seconda specie in termini di frequenza d'isolamento con 61 soggetti positivi. Sporadicamente sono state isolate altre specie batteriche considerate causa di onfalite del pulcino quali *Stafilococchi* coagulasi positivi (2) (*S. aureus*, *S. delphini*), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Proteus mirabilis* (7), *Klebsiella pneumoniae* (3) ed *Enterobacter cloacae* (2). Inoltre vi sono stati occasionali isolamenti di specie batteriche il cui ruolo nelle infezioni ombelicali del pulcino non è noto quali *Brevundimonas diminuta* (1), *Penibacillus lactis* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1), *Staphylococcus gallinarum* (1), *Staphylococcus hominis* (1) e *Staphylococcus xylosum* (2).

### Sensibilità di *Enterococcus* spp. agli antibiotici

I risultati dei test di farmacosenibilità vengono riportati in tabella 1.

Tutti i ceppi testati sono risultati sensibili a penicillina e amoxicillina in base al breakpoint (8 µg/ml), comune a tutti i membri appartenenti al genere *Enterococcus* spp. (CLSI, 2013). Per tali molecole non si sono osservate differenze nella distribuzione dei valori di MIC tra le tre specie testate. Per quanto riguarda la tilosina, considerando il breakpoint pari a 1 µg/ml (NARMS, 2010), è possibile notare differenze sostanziali tra le diverse specie batteriche. Infatti, tutti i ceppi di *E. faecalis* ed *E. faecium*, con un'unica eccezione, si sono dimostrati resistenti (MIC<sub>90</sub> di *E. faecalis* > 256 µg/ml), mentre il valore di MIC<sub>90</sub> di *E. gallinarum* si è attestato a 1 µg/ml. Nel caso della tilmicosina non sono disponibili breakpoint e i valori di MIC<sub>90</sub> di *E. gallinarum* sono risultati sensibilmente inferiori rispetto a quelli di *E. faecalis* (16 µg/ml e >256 µg/ml rispettivamente). I valori di MIC della tiamulina nei confronti di *E. faecalis* e *E. gallinarum* si sono dimostrati elevati e sovrapponibili (MIC<sub>90</sub> = 256 µg/ml). Nel caso dell'ossitetraciclina è possibile osservare una distribuzione bimodale dei ceppi di *E. faecalis* ed *E. gallinarum* rispetto ai valori di MIC. In particolare è possibile distinguere una sub-popolazione di ceppi più numerosa che presenta valori di MIC compresi tra 32 µg/ml e 128 µg/ml e una più esigua che si attesta sul valore di 0,5 µg/ml. Gli enterococchi vengono definiti sensibili alle tetracicline per valori di MIC < a 4 µg/ml e resistenti con MIC > a 8 µg/ml (CLSI, 2013). In base a questi breakpoint la sub-popolazione più numerosa può essere considerata resistente alle tetracicline, mentre 3/4 ceppi di *E. faecium* hanno mostrato valori di MIC che si collocano nel range di sensibilità per le tetracicline.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La presente indagine dimostra una diffusa contaminazione del sacco vitellino di pulcini sani di un giorno di vita ad opera di specie microbiche ritenute causa di onfalite e mortalità neonatale. È noto che il pulcino possa nascere già con il sacco vitellino contaminato da *Salmonella* o *E. coli* in seguito ad infezioni dell'ovaio della madre (Barns *et al.*, 2008), ma la presenza di flore microbiche fecali a trasmissione non verticale quali *Enterococcus* spp. nel sacco vitellino, a poche ore dalla nascita, può trovare giustificazione solo nelle scadenti condizioni igieniche dell'incubatoio. Anche l'incubazione di uova con elevato grado di contaminazione batterica del guscio o con incrinature, può concorrere a favorire la nascita di soggetti infetti.



Non si esclude che le stesse pratiche di vaccinazione “in ovo” di partite con guscio particolarmente imbrattato o eseguite con attrezzature infette possano facilitare una contaminazione interna dell’uovo, comportando mortalità embrionale o la nascita di soggetti infetti. E’ stato dimostrato inoltre che la contaminazione del sacco vitellino da parte di Enterococchi, pur non provocando sistematicamente un aumento della mortalità embrionale o perinatale, riduce in modo significativo l’assorbimento dei nutrienti e soprattutto degli anticorpi materni, favorendo la nascita di soggetti ipovitali e immunodepressi (Sander *et al.*, 1998).

I risultati di farmacosenibilità delle specie microbiche isolate più frequentemente nel corso del presente studio (Enterococchi), hanno rivelato una diffusa sensibilità nei confronti di farmaci definiti “di prima scelta” in terapia animale quali la penicillina e l’amoxicillina, indipendentemente dalla specie di *Enterococcus* spp. testata. Al contrario i macrolidi (tilosina, tilmicosina) e la tiamulina hanno dimostrato risultati incostanti e comunque legati alla specie batterica. In particolare quasi tutti i ceppi di *E. gallinarum* si sono dimostrati sensibili alla tilosina mentre i ceppi delle altre specie di Enterococchi resistenti. Nel caso dell’ossitettraciclina non vi sono state differenze significative di specie e i risultati sono simili a quelli riportati in bibliografia per *E. faecalis* (Furtula *et al.* 2013). Dato il frequente isolamento di *E. coli* è evidente che eventuali trattamenti farmacologici di gruppi affetti da onfalite dovrebbero comprendere anche farmaci attivi nei confronti di batteri Gram negativi, ma tali pratiche non possono sostituirsi a un rigoroso rispetto delle operazioni di pulizia e disinfezione in incubatoio.

## BIBLIOGRAFIA

Barnes HJ, LK Nolan, Vaillencourt JP. (2008). Colibacillosis. In: Saif JM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th Edn., Blackwell Publishing, London, pp. 703-705.

Buhr RJ, Northcutt JK, Richardson LJ, Cox NA, Fairchild BD. (2006). Incidence of unabsorbed yolk sacs in broilers, broiler breeder roosters, white leghorn hens, and Athens-Canadian random bred control broilers. *Poultry Sci.* 85:1294–1297.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). Manual VET01-A4. Performances Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Fourth Edition.

Cortes PL, Shivaprasad HL, Kiupel M, Senties-Cué G. (2005). Omphalitis associated with *Aspergillus fumigatus* in poults. *Avian Dis.*, 49:304-308.

Furtula V, Jackson CR, Farrell EG, Barrett JB, Hiott LM, Chambers PA. (2013). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in an area of intensive poultry production. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10:1020-1036.

Khan KA, Khan SA, Aslam A, Rabbani M, Tipu MY. (2004). Factors contributing to yolk retention in poultry: a review. *Pakistan Vet. J.*, 24(1):46-51.

Lister SA., Barrow P. (2008). Enterobacteriaceae. In: Pattison M., McMullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ (Eds.), *Poultry diseases*, Saunders Elsevier press, Toronto, pp. 110-145.

NARMS—National Antimicrobial Resistance Monitoring System Animal Isolates, USDA. Available online: <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=22435>.

Sander EJ, Willingham EM, Wilson JL, Thayer SG. (1998). The effect of inoculating *Enterococcus faecalis* into the yolk sac on chick quality and maternal antibody absorption. *Avian Diseases*, 42, 359-363.

Terregino C, Catelli E, Zanoni R, Giordano S, Sanguinetti V. (2000). Considerazioni su cause di mortalità neonatale del pollo da carne. *Rivista di avicoltura*, 4:34-40.

**Tabella 1.** Risultati di MIC di *Enterococcus* spp. isolati dal sacco vitellino di pulcini di 1 giorno

µg/ml	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	MIC 50	MIC 90
<b>Penicillina</b>																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	2	8	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	8	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Amoxicillina</b>																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	1	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tilosina</b>																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	3	5	256	>256
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-
<b>Tilmicosina</b>																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	8	256	>256
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	8	1	-	-	-	-	1	8	16
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	-	-
<b>Tiamulina</b>																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	6	-	256	256
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	8	-	256	256
<i>E. faecium</i>	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<b>Ossitettraciclina</b>																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	3	-	-	-	-	-	1	-	6	-	-	128	128
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	5	1	-	-	64	64
<i>E. faecium</i>	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-

## EPISODI DI COINFEZIONE CLOSTRIDICA IN OVAIOLE COMMERCIALI

Berto G., Agnoletti F., Drigo I., Tonon E., Vascellari M., Tarticchio G., Marcon B., Ferro T., Bano L.

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

### Summary

The present report describes two outbreaks of serious enteritis caused by *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) and *Clostridium colinum* (*C. colinum*) coinfection in commercial laying hens. At the age of 44 and 31 weeks, two laying hen flocks showed an increase of the mortality rate and a worsening of productive performance. Post-mortem examination revealed intestinal necrotic-hemorrhagic ulcerations and hepatic focal necrosis. The bacteriological examination yielded the isolation of *C. colinum* and *C. perfringens* toxinotype A, NetB positive. In one outbreak *C. colinum* was detected also by PCR in all the intestines of affected birds.

In laying hens *C. colinum* has never been isolated but its presence has been revealed by molecular techniques and associated with a slight enteric disease called duodenal focal necrosis. The present case report was characterized by severe enteritis presumably due to the synergistic effect of *C. colinum* and *C. perfringens*.

### INTRODUZIONE

Le enteriti batteriche della gallina ovaiole (*Gallus gallus*) sono per lo più sostenute da microrganismi anaerobi appartenenti ai generi *Clostridium* e *Brachyspira* (1). Tra queste patologie la più frequente è rappresentata dall'enterite necrotica (EN), causata da *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), un bacillo anaerobio Gram positivo sporigeno che esplica la sua azione patogena attraverso la produzione di diversi tipi di tossine. *C. perfringens* viene classificato in 5 tossinotipi (A, B, C, D, E) in relazione alle diverse combinazioni di tossine maggiori prodotte. Storicamente l'EN è associata ai tossinotipi A e C (2), tuttavia ricerche condotte in diversi paesi hanno dimostrato l'implicazione del solo tossinotipo A (2, 3) caratterizzato dalla produzione di tossina  $\alpha$ . In passato si riteneva che l' $\alpha$ -tossina, prodotta da tutti i ceppi di *C. perfringens*, fosse un fattore di virulenza indispensabile per la comparsa della malattia (4,5), ma oggi si sa che la sua presenza non è necessaria per la formazione del quadro lesivo tipico (6). La tossina ad oggi ritenuta più importante nell'eziopatogenesi dell'EN è una "pore-forming protein" denominata NetB (7). Il quadro clinico ed anatomopatologico può risultare più grave se i ceppi coinvolti risultano produttori anche di una tossina appartenente al gruppo delle "large clostridial cytotoxins" denominata TpeL (8). L'EN colpisce classicamente polli da carne d'età compresa fra 2 e 6 settimane di vita, anche se non mancano segnalazioni di patologia conclamata in pollastre e ovaiole commerciali di età compresa fra 3 e 9 mesi (9,10).

Altra patologia enterica ad eziologia clostridica del pollame è l'enterite ulcerativa (EU), sostenuta da *Clostridium colinum* (*C. colinum*), che colpisce prevalentemente il Colino della Virginia (*Colinus virginianus*), nel quale la patologia assume spesso carattere epidemico. L'infezione da *C. colinum* è stata segnalata anche nel pollo e riprodotta sperimentalmente (11). Anche in questo caso il batterio sembrerebbe

svolgere un ruolo patogeno unitamente a fattori predisponenti, fra i quali vanno considerati la coccidiosi, la malattia di Gumboro, l'anemia infettiva e fattori stressogeni (12). Nella gallina ovaiole *C. colinum* è stato associato ad una patologia che prende il nome di "duodenal focal necrosis" (DFN) in virtù della localizzazione delle lesioni necrotiche. In questa malattia la presenza di *C. colinum* è stata evidenziata solo mediante tecniche di biologia molecolare (DGGE, T-RFLP) ma il microrganismo non è stato mai isolato e le lesioni non sono mai state riprodotte sperimentalmente (13).

### MATERIALI E METODI

#### Dati anamnestici

Nel corso del 2013 in un allevamento di galline ovaiole commerciale Hyline si sono osservati 2 episodi di malattia caratterizzati da un improvviso incremento della mortalità. Il primo episodio si è verificato in giugno ed ha riguardato un gruppo di 44000 soggetti di 47 settimane, il secondo si è verificato a dicembre in un gruppo 18300 soggetti di 31 settimane.

Entrambi i gruppi di animali erano stabulati in voliera e in capannoni diversi. L'allevatore riferiva un improvviso peggioramento delle performance produttive con una diminuzione della pezzatura dell'uovo, un calo del consumo alimentare e una mortalità dello 0,5 ‰. Nel gruppo di 31 settimane inoltre veniva segnalata la presenza di animali con sintomatologia gastroenterica localizzati solo in una parte del capannone.

#### Esami batteriologici

Gli accertamenti batteriologici eseguiti su organi con lesioni macroscopiche (principalmente fegato e intestino), sono stati condotti in agar sangue esculina (ASE), Perfringens agar base (PAB), cooked meat medium (CMM) ed eosin methylene blue (EMB). Le piastre di ASE ed EMB sono state incubate per 24 ore a  $37 \pm 1$  °C in condizioni di aerobiosi mentre PAB, CMM e una seconda piastra di ASE sono stati incubati alla stessa temperatura in condizioni di anaerobiosi, per 24-48 ore. I terreni sono stati ispezionati dopo 24 e 48 ore. L'identificazione degli isolati è stata effettuata tramite MALDI-TOF MS (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics).

#### Accertamenti collaterali

Campioni di fegato con lesioni macroscopicamente evidenti sono stati sottoposti ad accertamenti virologici ed istopatologici. L'esame virologico è stato condotto tramite microscopia elettronica, isolamento in uova embrionate e colture cellulari convenzionali. Per l'accertamento istologico, porzioni di fegato e intestino sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sezionati a 4  $\mu$ m. Sulle sezioni ottenute è stata eseguita colorazione con ematossilina-eosina e i preparati sono stati osservati al microscopio ottico.

E' stato inoltre condotto un esame parassitologico tramite osservazione microscopica diretta di raschiati intestinali effettuati sia dal tenue che dai ciechi, a livello di lesioni macroscopiche.

#### Ricerca di *C. colinum* e tossinotipizzazione di *C. perfringens*

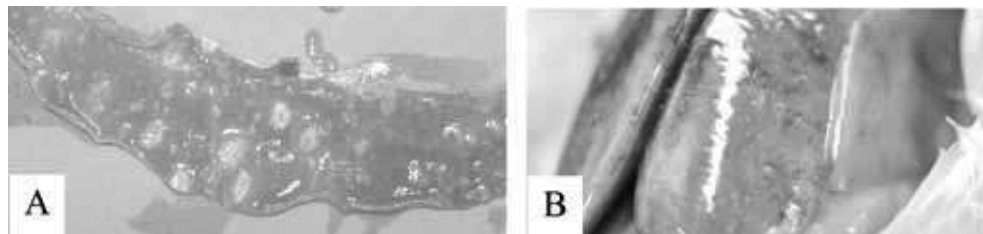
I ceppi di *C. perfringens* sono stati tossinotipizzati mediante multiplex-PCR (14) ed è stato ricercato il gene codificante la tossina NetB (15). E' stata inoltre indagata

tramite PCR la presenza di *C. colinum* in tratti intestinali interessati da lesioni evidenti (16).

## RISULTATI

All'esame anatomo-patologico il quadro lesivo maggiormente caratteristico era rappresentato da enterite necrotico-ulcerativa a carico del tratto intestinale intermedio e dei ciechi (figura 1, A). Le lesioni erano tondeggianti, di diametro variabile (0,5 - 3 mm), con centro necrotico-emorragico, margini rilevati e occasionalmente coalescenti. Le ulcerazioni di maggiore diametro erano visibili anche attraverso la sierosa dell'intestino mentre in alcuni tratti della mucosa erano sporadicamente presenti aree necrotiche tondeggianti di 1-2 cm di diametro. In prossimità degli sbocchi ciecali si osservava la presenza di stampi caseosi costituiti da materiale necrotico mentre il lume del cieco era occupato da materiale patologico a carattere prevalentemente emorragico, originato da ulcerazioni disseminate sulla mucosa e visibili dopo lavaggio della stessa. Il fegato era interessato da epatite necrotica a focolai (figura 1, B) mentre le milze erano generalmente non reattive, pallide ma con soffiusioni emorragiche sulla superficie.

Istologicamente si rilevava enterite necrotica con vari stadi di erosione della mucosa, associata alla presenza di aggregati batterici ed infiltrazione linfoplasmocitaria diffusa. Il fegato era interessato da epatite eterofilico-necrotica multifocale associata ad aggregati batterici e steatosi diffusa degli epatociti. L'esame batteriologico ha portato all'isolamento di *C. perfringens* tossinotipo A in alta carica dall'intestino di soggetti di entrambi i gruppi. Alcuni ceppi di *C. perfringens* isolati nel corso del primo focolaio sono risultati anche positivi al gene codificante la tossina NetB. Dal fegato di un soggetto con lesioni necrotiche è stato possibile isolare *C. colinum* identificato sia tramite MALDI-TOF MS sia tramite PCR, mentre non sono state eseguite PCR dirette dal contenuto intestinale. Nel secondo gruppo in tutti gli intestini esaminati erano presenti sia *C. perfringens* che *C. colinum*. Gli accertamenti virologici hanno dato esito negativo mentre, all'esame parassitologico, è stata rilevata la presenza di scarse oocisti coccidiche solo in tre soggetti dei 12 esaminati.



**Figura 1.** Enterite ulcerativa (A) ed epatite necrotica a focolai (B).

## DISCUSSIONE

L'enterite necrotica è una malattia tipica del pollo da carne che sempre più frequentemente viene segnalata nell'ovaiola. La differente suscettibilità all'EN da parte di due categorie produttive appartenenti ad una stessa specie animale (broiler e ovaiole), va ricercata più nella possibilità che fattori predisponenti (es. coccidiosi) possano contribuire all'insorgenza della patologia o alla gravità con cui si manifesta piuttosto che in

una diversa sensibilità legata all'età dell'ospite. In ogni caso le lesioni che solitamente si osservano in episodi di EN dell'ovaiola, non raggiungono la gravità del quadro anatomopatologico precedentemente descritto. In entrambi i gruppi colpiti è stata rilevata la simultanea presenza di *C. perfringens* e di *C. colinum*. Alcuni ceppi isolati dal primo gruppo erano anche dotati del gene codificante la tossina NetB mentre la presenza di *C. colinum* non è stata inizialmente sospettata e quindi indagata direttamente dalle lesioni intestinali. L'inaspettato isolamento di *C. colinum* da fegato ha permesso di collegare successivamente le lesioni a un possibile caso di EU. Nel secondo caso, verificatosi a distanza di 6 mesi in un altro gruppo di ovaiole, la presenza di *C. colinum* è stata indagata direttamente tramite PCR permettendo di evidenziare la presenza di *C. colinum* in tutti i soggetti colpiti.

Nel presente caso clinico risulta impossibile stabilire con certezza a quale fra i due clostridi vada attribuito il ruolo eziologico primario, comunque è di particolare interesse l'isolamento di *C. colinum* da fegato che presentava le classiche lesioni necrotiche, solitamente segnalate in presenza di EU in altre specie animali. Le uniche segnalazioni di EU nell'ovaiola si riferiscono ad una duodenite necrotica focale in cui *C. colinum* non è mai stato isolato ma identificato tramite metodi molecolari. Una simultanea coinfezione di *C. colinum* e *C. perfringens* nella gallina ovaiole non è mai stata riportata. Nel colino della Virginia invece Beltran-Alcrudo *et al* 2007 (17) riporta l'isolamento di entrambi i batteri in un caso di enterite ulcerativa considerando *C. colinum* come agente primario della patologia ed attribuendo a *C. perfringens* un ruolo secondario.

In seguito alla diagnosi di clostridiosi intestinale gli animali sono stati trattati per 5 giorni con tilosina nell'acqua di bevanda (50 g/100 L). È noto che ceppi di *C. perfringens* isolati da ovaiole risultano sensibili alla tilosina (18) ma la mancanza di terreni selettivi per *C. colinum* rende difficoltoso l'isolamento da organi particolarmente contaminati e di conseguenza l'esecuzione dei test per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici. Il fatto che dopo il trattamento si sia assistito ad una remissione della sintomatologia lascia ritenere che anche *C. colinum* possa essere sensibile a questa molecola.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hampson DJ, Swayne DE. (2008). Avian intestinal Spirochetosis. In: Saif JM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th Edn., Blackwell Publishing, London, pp. 922-940.
2. Songer JG. (1996). Clostridial enteric disease of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(2):216-234
3. Olkowski AA, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, Laarveld B, Sawicki G. (2008). Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. *Res. Vet. Sci.* 85:543-553
4. Al-Shiekhly F, Truescott RB. (1977). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis.* 21: 230-240
5. Al-Shiekhly F, Truescott RB. (1977). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis.* 21:241-255

6. Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson M M, Award M M, Rood JI, Moore RJ (2006). Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74(11): 6496-6500
7. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannma TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4:0001-0011
8. Coursodon CF, Glock RD, Moore KL, Cooper KK, Songer JG. (2012). TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaer.* 18:117-121
9. Kwatra YK, Lee YJ, Mo IP. (2004). A presumptive diagnosis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*) from Assam (India). *Avian Dis.* 20:401-406
10. Barnes HJ, Wages DP, Opengart K. (2008). Clostridial disease. In: Saif JM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th Edn., Blackwell Publishing, London, pp. 865-879.
11. Berkhoff GA, Campbell SG. (1973). Etiology and pathogenesis of ulcerative enteritis (quail disease). The experimental disease. *Avian Dis.* 18(2):205-2012
12. Davis RB. (1973). Ulcerative enteritis in chickens: coccidiosis and stress as predisposing factors. *Poult Sci.* 52:1283-1287
13. Baltzely TA, Dunham SM, Lago F, Rehberger TG, Siragusa GR. (2008). Molecular pathogenesis markers of focal duodenal necrosis in layer hens. Proceedings of the 80th Northeastern conference on Avian diseases.
14. Yoo HS, Lee SU, Park YH. (1997). Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin Microbiol.* 35:228-232
15. Baums CG, Schotte U, Amtberg G, Goethe R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol.* 100:11-16
16. Bano L, Drigo I, Macklin KS, Martin RS, Miller RS, Norton RA, Oyarzabal OA, Bilgili SF. (2008). Development of a polymerase chain reaction assay for specific identification of *Clostridium colinum*. *Avian Pathol.* 37:179-181
17. Beltran-Alcrudo D, Cardona C, McLellan L, Reimers N, Charlton B. (2008). A persistent outbreak of ulcerative enteritis in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Dis.* 52:531-536
18. Bano L, Bacchin C, Marcon B, Fracas V, Giovanardi D, Drigo I, Agnoletti F. (2013) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* field strains isolated from commercial turkeys, broilers and layer hens. XIIIth WVPA (world veterinary pathology association) Congress. Nantes, FR, 19-23 settembre. p 672

## FILOGENESI DI *CIRCOVIRUS* SULLA BASE DELLE SEQUENZE DEL GENOMA COMPLETO IDENTIFICATI IN SPECIE DIVERSE DI PAPPAGALLI

Caroli A., Pugliese N., Camarda A., Legretto M., Marino M., Circella E.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S. P. per Casamassima km. 3, 70010, Valenzano, Bari.

### ABSTRACT

*BFDV*, *Beak and Feather Disease Virus*, appartiene alla famiglia *Circoviridae* e al genere *Circovirus* (Bassami et al, 1998). A tale genere appartengono virus identificati in numerose altre specie come il suino, *Porcine Circovirus* (PCV-1, PCV-2) (Hamel et al, 1998), e virus identificati nei volatili, nel piccione *Pigeon Circovirus* (PiCV) (Mankertz et al, 2000), nell'oca *Goose Circovirus* (GoCV) (Todd et al, 2001b), nel canarino *Canary Circovirus* (CaCV) (Todd et al, 2001), nell'anatra *Duck Circovirus* (DuCV) (Todd et al, 2005), nel gabbiano *Gull Circovirus* (GuCV) (Twentyman et al, 1999), nel Diamante di Gould *Finch Circovirus* (FiCV) (Shivaprasad et al, 2004), nel corvo australiano *Australian raven Circovirus* (RaCV) (Stewart et al, 2006), nello storno *Starling Circovirus* (StCV) (Dayaram et al, 2013), e nel cigno *Swan Circovirus* (SwCV) (Halami et al, 2008).

*BFDV* è responsabile nei pappagalli di una patologia denominata "Malattia del becco e delle penne" (Psittacine Beak and Feather Disease – PBFD), in virtù della localizzazione tipica delle lesioni riscontrate a livello del becco e delle penne (Gerlach, 1994). La patologia se pur descritta inizialmente in popolazioni di pappagalli selvatici in Australia (Paré et Robert, 2007), attualmente l'infezione è segnalata in tutto il mondo nei pappagalli allevati in cattività a seguito del commercio globale di volatili esotici, ed è stata identificata in più di 60 specie di psittacidi (Varsani et al, 2011). Non sempre l'infezione evolve con sintomi specifici evidenti (Circella et al. 2012), ma classicamente la PBFD può manifestarsi in tre diverse forme cliniche, iperacuta, acuta e cronica, in base all'età dei volatili colpiti (Gerlach, 1994). Le lesioni a carico del becco e delle penne appaiono più frequentemente nelle evoluzioni croniche (Todd et Gortazar, 2012). L'infezione è associata ad immunosoppressione che espone i pappagalli all'insorgenza di infezioni secondarie (Todd, 2000).

Le diverse forme con cui la malattia si manifesta sono legate inoltre a numerosi e complessi fattori tra cui la specie colpita, il livello di anticorpi materni, i diversi stipiti coinvolti nell'infezione, la dose infettante e la co-presenza di altri agenti patogeni (de Kloet et de Kloet, 2004).

In questo lavoro sono stati analizzati geneticamente stipiti di *circovirus* identificati in pappagalli infetti appartenenti a specie diverse, provenienti da differenti località del centro e sud Italia (tabella 1) ed è stata valutata un'eventuale correlazione tra stipite virale e forma clinica osservata nel soggetto infetto.

Per l'amplificazione della regione *rep* sono state allestite due diverse reazioni di PCR, con due differenti coppie di primer, *BFDV2/4* (Ypelaar et al., 1999) e *DCiVf/r* (Todd et al., 2001), che amplificano due diverse regioni del gene che in parte si sovrappongono. L'intero genoma dei ceppi oggetto di studio è stato amplificato mediante la tecnica del circolo-rotante (Dean et al., 2001), o mediante primer

disegnati sulla base delle regioni conservate del genoma. Per il completamento di tutte le sequenze genomiche secondo la tecnica del chromosome walking, sono stati disegnati e sintetizzati diversi oligonucleotidi.

Le sequenze genomiche ottenute sono state allineate tra loro e con un pannello rappresentativo di genomi di *BFDV* presenti in GenBank. Il genoma di riferimento di *Circovirus* del canarino (Todd et al. 2001) è stato utilizzato come radice per le successive analisi filogenetiche. La dimensione del genoma di tutti i virus identificati, amplificati e sequenziati era compresa tra 1.994 pb (IT03) e 2.010 pb (IT213). In tutte le sequenze sono state evidenziate le due ORF, *rep* e CP. Dall'analisi delle sequenze è emerso che, su tutte, è presente la sequenza altamente conservata TAGTATTAC, considerata il sito di potenziale origine di replicazione del genoma virale (Varsani et al., 2011), e che alcuni stipiti condividevano altre sequenze ripetute ed invertite soprattutto a monte e a valle dei due geni *rep* e CP. La struttura di tali regioni ripetute invertite ha i requisiti per originare delle strutture secondarie, pertanto è altamente probabile che si formi una struttura *Steam and loop* in queste regioni. I ceppi di *BFDV* nel complesso mostravano una distanza media, in percentuale di posizioni nucleotiche, del 5,9%. Nel particolare è possibile identificare una sostanziale identità tra i virus identificati nei cenerini, ad eccezione di mIT60 che mostrava un'identità più elevata con IT24 identificato nel cacatua. Tale dato risulta molto interessante considerato che i due virus, strettamente correlati filogeneticamente, venivano identificati in due volatili appartenenti a due famiglie differenti, *Cacatuidae* e *Psittacidae*. Infine i ceppi IT05 e IT06 mostravano un'identità del 100% derivando da due inseparabili che condividevano la stessa gabbia. In base alle percentuali di divergenza nucleotica (Varsani et al., 2011), è possibile individuare tre diversi ceppi: **a** (IT05 ed IT06, **b** comprendente tre varianti: **b1** (IT02 ed IT213), **b2** (IT24 ed IT60) e **b3** (IT30, IT32, IT47 ed IT54), e **c** (IT03).

Le sequenze genomiche dei virus identificati sono state comparate con un pannello scelto tra quelle presenti in GenBank. È interessante osservare che i virus riscontrati nei cenerini della variante B3 mostravano un'identità superiore al 98%, con una serie di virus identificati in Portogallo in cenerini e altri psittaciformi, che ugualmente avevano manifestato un'evoluzione acuta della malattia (Henriques et al., 2010). Dall'analisi dell'albero filogenetico emerge una parziale specificità d'ospite di *BFDV*, dato che alcune varianti sembrano prediligere specie ben precise, anche se le stesse varianti sono state poi identificate in ospiti di specie piuttosto distanti tra loro. Ad esempio sequenze corrispondenti ad IT03 (identificato nella cocorita) sono state riscontrate prevalentemente nelle cocorite, ma sono state riportate anche in un cacatua se pur in condizioni di forte promiscuità di specie. Complessivamente l'analisi filogenetica condotta su un pannello più ampio di virus chiarisce alcuni aspetti critici, come le relazioni clonali tra i ceppi, ma sembra indicare una scarsa specie-specificità d'ospite, in quanto virus identificati da specie di pappagalli distanti tra loro entrano a far parte degli stessi *clade*.

Tuttavia, va considerato che i valori di *bootstrap* sono piuttosto bassi e quindi le relazioni filogenetiche tra i virus possono variare notevolmente a seconda della regione genomica di riferimento. Sono state condotte analisi aggiuntive, per chiarire alcuni aspetti delle relazioni filogenetiche tra gli stipiti oggetto di studio, considerando singolarmente le sequenze dei geni *rep* e CP e valutando i possibili eventi ricombinativi. Da queste analisi emerge che i ceppi A e B1 abbiano avuto origine da un ancestore comune e che

successivamente un evento di ricombinazione che ha coinvolto il gene *rep*, li abbia separati. Pertanto, la variante **b1** può essere riclassificata come variante A2 del ceppo A. Alla luce di tutte le analisi condotte, i virus analizzati si possono riclassificare come: ceppo A, variante A1 (IT05 ed IT06); ceppo A, variante A2 (IT02 ed IT213); ceppo B, variante B1 (IT24, IT60 e IT82); ceppo B, variante B2 (IT30, IT32, IT47 e IT54) e ceppo C (IT03).

In conclusione, dalle analisi filogenetiche si può evincere che sicuramente esiste una certa predisposizione d'ospite di *BFDV*, ma non è esclusa la possibilità di un passaggio dello stesso stipite ad altre specie, soprattutto in condizioni di forte promiscuità e di contatto ravvicinato. Tali condizioni renderebbero possibile sia l'adattamento di un ceppo a più ospiti, sia la possibilità di coinfezioni nello stesso animale da parte di stipiti diversi, condizione favorevole per l'instaurarsi di eventi di ricombinazione che hanno un ruolo di fondamentale importanza nell'evoluzione di *BFDV*.

Pertanto per il controllo dell'infezione diventa fondamentale non solo applicare piani di controllo igienico-sanitario, ma anche evitare la stretta promiscuità di specie differenti.

## BIBLIOGRAFIA

**Bassami M.R., Berryman D., Wilcox G.E., Raidal S.R.** (1998). *Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses and chicken anaemia virus*. *Virology*. 249: 453-459.

**Circella C., Caroli A., Pugliese N., Legretto M., Todisco G., Di Paola G. Camarda A.** (2012). *Infezione da Circovirus nei volatili d'affezione: approccio diagnostico clinico e molecolare*. *Veterinaria*, Anno 26, n.6: 15-22.

**Dayaram A., Goldstien S., Zawar-Reza P., Gomez C., Harding J.S., Varsani A.** (2013). *Identification of Starling Circovirus in an Estuarine Mollusc (Amphibola crenata) in New Zealand Using Metagenomic Approaches*. *Genome Announcements*. Vol.1(3): e00278-13.

**de Kloet E., de Kloet S.R.** (2004). *Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity*. *Archives of Virology*. 149: 2393-2412.

**Dean F.B., Nelson J.R., Giesler T.L., and Lasken R.S.** (2001). *Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification*. *Genome Research*. 1095-1099.

**Gerlach H.** (1994). *Circoviridae - Psittacine Beak and Feather Disease Virus*. In: Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. (Eds.) *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth pp. 894-902.

**Halami M.Y., Nieper H., Muller H., Johne R.** (2008). *Detection of novel circovirus in mute swans (Cygnus olor) by using nested broad-spectrum PCR*. *Virus Research*. 132(1-2):208-12.

**Hamel A.L., Lin L.L., Nayar G.P.** (1998). *Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs*. *Journal of Virology*. 72: 5262-5267.

**Henriques A.M., Fagulha T., Duarte M., Ramos F., Barros S., Luis T., Bernardino R., Fevereiro M.** (2010). *Phylogenetic analysis of six isolates of beak and feather disease virus from African Grey Parrots in Portugal*. Avian Diseases. 54: 1066-1071.

**Mankerts A., Hattermann K., Ehlers B., Soike D.** (2000). *Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons*. Archives of Virology. 145: 2469-2479.

**Paré J.A., Robert N.** (2007). *Infectious diseases of wild birds*. In: Thomas N.J., Hunter D.B., Atkinson C.T. (Eds) Blackwell, Oxford, UK. pp. 194-205.

**Shivaprasad H.L., Hill D., Todd D., Smyth J.A.** (2004). *Circovirus infection in a Gouldian gouldiae*. Avian Pathology. 33: 525-529.

**Stewart M.E., Perry R., Raidal S.R.** (2006). *Identification of a novel circovirus in Australian ravens (Corvus coronoides) with feather disease*. Avian Pathology. 35: 86-92.

**Todd D.** (2000). *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. Avian Pathology. 29: 373-394.

**Todd D., Bendinelli M., Biagini P., Hino S., Mankertz A., Mishiro S., Niel C., Okamoto H., Raidal S., Ritchie B.W., Teo G.C.** (2005). *Circoviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., L.A. Ball (Eds) *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, pp. 327-334.

**Todd D., Gortazar C.** (2012). *Circovirus infection*. In: Infection Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe. Edited by: Gavier-Widen D., Duff J.P., Meredith A. Wiley-Blackwell Publishing. Cap. 4: 67-72.

**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.

**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.

**Todd D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A.** (2001 b). *Genome sequence determination and analyses of novel circovirus from goose and pigeons*. Virology 286: 354-362.

**Twentyman C.M., Alley M.R., Meers J., Cooke M.M., Duignan P.J.** (1999). *Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (Larus dominicanus)*. Avian Pathology. 28: 513-516.

**Varsani A., Regnard G.L., Bragg R., Hitzeroth I.I., Rybicki E.P.** (2011). *Global genetic diversity and geographical and host-species distribution of beak and feather disease virus isolates*. Journal of General Virology. 92:752-767.

**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*. Veterinary Microbiology. 68(1-2): 141-148.

**Tabella 1: Circovirus oggetto di studio identificati in pappagalli**

Denominazione Circovirus	Specie	Età	Sintomatologia manifestata	Provincia (anno di identificazione del virus)
IT02	Conuro del sole ( <i>Aratinga solstitialis</i> )	~3 anni	Patologie secondarie ricorrenti	Bari (2008)
IT03	Pappagallino ondulato ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	1 anno	Anoressia, letargia, morte	Bari (2008)
IT05	Inseparabile collo rosa ( <i>Agapornis roseicollis</i> )	1 anno	Patologie secondarie ricorrenti	Teramo (2008)
IT06	Inseparabile collo rosa ( <i>Agapornis roseicollis</i> )	1 anno	Patologie secondarie ricorrenti	Teramo (2008)
IT24	Cacatua bianco ( <i>Cacatua alba</i> )	6 mesi	Patologie secondarie ricorrenti	Brindisi (2010)
IT30	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )	3,5 mesi	Anoressia, letargia, morte	Taranto (2010)
IT32	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )	2,5 mesi	Anoressia, letargia, morte	Taranto (2010)
IT47	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )	3 mesi	Anoressia, letargia, morte	Brindisi (2010)
IT54	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )	6 mesi	Anoressia, letargia, morte	Bari (2011)
IT60	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )	7 mesi	Anoressia, letargia, morte	Bari (2011)
IT213	Inseparabile collo rosa ( <i>Agapornis roseicollis</i> )	~1 anno	Alterazioni del piumaggio	Foggia (2013)

## STUDIO RETROSPETTIVO SULL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA IOWAE* NEL SETTORE TACCHINO DA CARNE

Catania S.<sup>1</sup>, Santone C.<sup>1</sup>, Boscaro G.<sup>1</sup>, Sturaro A.<sup>1</sup>, Flaminio B.<sup>1</sup>, Gobbo F.<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina aviaria - U.O. Micoplasmi; Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia

Corresponding author: [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)

### SUMMARY

*Mycoplasma iowae* (MI) is an avian mycoplasma affecting mainly turkey with decreased hatchability due to late embryonic mortality, moreover in experimentally infected poult chicks poor growing, abnormal feather and skeletal abnormalities were reported.

Recently some Authors have reported field cases of skeletal abnormalities affecting legs' bones or joints with a specific form of arthrosynovitis.

The aim of this report is to share the results of a retrospective study of 103 cases occurring in the meat turkey sector, routinely submitted for necropsy examination during the period October 2011- September 2012.

A standard necropsy examination and a standard gross-pathology protocol was applied in all examined carcasses and *Mycoplasma spp.* detection was performed in each turkey group through cloaca swab sampling.

A total number of 56 out of 103 groups resulted positive for *Mycoplasma iowae* isolation.

Basing on the gross pathological evidences and the laboratory results, we decide to perform a statistical analysis in order to point out any relationship between the positivity for MI and other laboratory results. We demonstrated that the probability to find a MI-positive flock is 4 times higher in flocks where legs abnormalities were noticed (OR=4.5, IC 95%: 1.71 – 12.16). Moreover the incidence of *Eimeria spp.* in gut was statistically higher in the MI infected groups.

MI infection could contribute to the alteration of intestinal environment predisposing an increase of *Coccidia* load and legs abnormalities, likely causing poor growth performances.

Finally a specific clinical form was observed in the Italian turkey meat sector during the years 2011-2012 and *Mycoplasma iowae* seemed to be correlated with that.

Therefore it is recommended to plan an experimental infection with a recent isolate of *Mycoplasma iowae* in new meat-turkey genetic line in order to elucidate its pathogenic role in the development of gross-pathology lesions and if it can promote and/or influence other pathogens infection.

### INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma iowae* (MI) è considerato come specie di interesse per il settore avicolo e nello specifico nel settore tacchino. Tale patogeno in passato ha mostrato un importante impatto sulla produzione, specificatamente attribuito alla scarsa

schiusibilità delle uova prodotte da gruppi di riproduttori infetti. Attraverso infezioni sperimentali, eseguite sia su tacchino che su pollo, l'MI ha determinato uno scarso accrescimento, con evidenti alterazioni dello sviluppo osseo, oltre a forme di lieve aerosacculite, artrosinovite ed anomalie del piumaggio.

Al fine di contenere la problematica nel settore tacchino importanti ed efficaci piani di risanamento sono stati applicati in passato. Recentemente sia negli Stati Uniti che in Italia è stato segnalato l'isolamento di *Mycoplasma iowae* in tacchini da carne, in cui era stato riscontrato un anormale accrescimento associato a gravi alterazioni ossee (Catania *et al.*, 2012, Ley *et al.* 2010, Trampel *et al.*, 1994).

Al fine di verificare l'associazione tra *Mycoplasma iowae* e le problematiche riscontrabili nei gruppi infetti ci siamo proposti di analizzare i dati in nostro possesso ottenuti durante un periodo di 12 mesi, utilizzando i campioni di tacchino industriale conferiti presso il nostro laboratorio come attività diagnostica.

### MATERIALI E METODI

103 gruppi di tacchini sono stati analizzati durante il periodo Ottobre 2011- Settembre 2012 presso i nostri laboratori e inclusi nel presente studio.

Le carcasse conferite per ogni gruppo di animale sono state sottoposte ad un protocollo diagnostico *standard* di base ed in seguito a determinate evidenze anatomopatologiche venivano richiesti esami diagnostici specifici che naturalmente potevano variare a seconda della problematica del gruppo.

Il protocollo *standard* di base, e quindi applicato tutti i gruppi del presente studio, prevedeva il rilevamento delle anomalie di sviluppo osseo sia a carico degli arti inferiori che della colonna vertebrale, l'esame parassitologico a fresco del tratto prossimale e distale dell'intestino, la colorazione Diff-Quick da impronte intestinali e l'isolamento micoplasmi da intestino.

La nostra metodica di isolamento micoplasmi prevede il tampone a livello intestinale, che viene prontamente stemperato in brodo ed incubato a 37°C ed al 5% di CO<sub>2</sub> per almeno 15 giorni, i brodi vengono valutati giornalmente ed in seguito ad evidenza di torbidità o variazione del pH vengono seminati in agar, di contro in caso di assenza di crescita evidente al 15° giorno si procede ad un secondo passaggio in brodo e si seminano le piastre in agar e si mantengono i campioni per ulteriori 15 giorni alle medesime condizioni di incubazione. La negatività del campione viene refertata dopo che dal secondo passaggio (brodo ed agar) e trascorsi i 15 giorni non viene dimostrata alcuna evidenza di crescita.

I campioni positivi vengono sottoposti alla PCR-DGGE (Battanelli *et al.*, 2010) per l'esecuzione dell'identificazione della specie di micoplasma isolata.

### RISULTATI

Dei 103 gruppi esaminati 56 sono risultati essere positivi al *Mycoplasma iowae*, tali positivi sono stati riscontrati principalmente nelle classi di età tra la 3° e la 5° settimana, anche se abbiamo riscontrato positività in un gruppo di 98 giorni. Dei 103 gruppi esaminati 41 mostravano la presenza di coccidi ed in particolare 14 classificati come alta, 22 come bassa quantità e 5 non classificati. Inoltre 11 gruppi hanno manifestato positività per *Trichomonas spp.*. Dal punto di vista anatomopatologico, 36 gruppi hanno mostrato anomalie ossee specificatamente localizzate agli arti inferiori, 59 gruppi hanno mostrato alterazioni a carico dei sacchi aerei, 70 gruppi

mostravano segni di enterite ed infine in 33 gruppi è stato possibile rilevare ipertrofia renale. Altre lesioni considerate caratteristiche dell'infezione da MI, come il *wry neck*, sono state rilevate, anche se in un numero esiguo di animali e solamente in un gruppo.

Dall'analisi statistica effettuata, i dati che mostrano significatività statistica tra infezione da MI e le evidenze di laboratorio, risultano essere le anomalie ossee a carico degli arti inferiori e la presenza di coccidi. Mentre per quanto riguarda gli altri parametri rilevati non è stata evidenziata significatività statistica. In particolare è risultato che la probabilità di diagnosticare un soggetto positivo al *Mycoplasma iowae* è quattro volte superiore per i soggetti che presentano anomalie agli arti inferiori (OR=4.5, IC 95%: 1.71 – 12.16), ed inoltre che la probabilità di registrare un esito positivo al *Mycoplasma iowae* risulta tre volte superiore qualora si registri un esito positivo per *Eimeria* (OR=3.4, IC 95%: 1.36 – 8.53).

### CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si evince che la presenza del *Mycoplasma iowae* nel settore tacchino da carne sembra avere un impatto sulle *performance* produttive. Inoltre le lesioni riscontrate a carico degli arti inferiori così come la presenza di coccidi sembra avere un valore prognostico piuttosto importante nell'avanzare un sospetto di infezione da MI.

La presenza di una correlazione statistica tra MI e coccidi a livello intestinale, può essere interpretata con una alterazione dell'ambiente intestinale che favorisce la colonizzazione dei coccidi. Infine è possibile ipotizzare che la presenza dell'infezione intestinale da MI possa alterare anche le funzioni di questo delicato organo, determinando le alterazioni di sviluppo osseo che si possono manifestarsi con le tipiche deformazioni degli arti inferiori.

### BIBLIOGRAFIA

1. Battanoli G., Brustolin M., Bilato D., Gobbo F., Qualtieri K., McAuliffe and Catania S. Utilizzo della DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) per l'identificazione delle specie di micoplasmi in campo avicolo. XII Congresso Nazionale SIDILV. Genova 27-29 Ottobre 2010. pag 63-64.
2. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Fincato A, Battanoli G, Iob L. Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. *Vet Rec.* 2012 Jan;170(4):107-8.
3. Ley D.H., Marusak R.A., Vivas E.J., Barnes H.J., Fletcher O.J. (2010). *Mycoplasma iowae* associated with chondrodystrophy in commercial turkeys. *Avian Pathol.* Apr; 39 (2): 87-93. Erratum in: *Avian Pathol.* 2010 Aug; 39 (4): 307.
4. Trampel DW, Goll F Jr. Outbreak of *Mycoplasma iowae* infection in commercial turkey poults. *Avian Dis.* 1994 Oct-Dec;38(4):905-9.

*Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 "Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole."*

### INFEZIONE DA *CIRCOVIRUS* NELLA GRU CORONATA (*BALEARICA REGULORUM*). CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEL VIRUS IDENTIFICATO

Circella E., Caroli A., Legretto M., Pugliese N., Marino M., Camarda A.

*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S. P. per Casamassima km. 3, 70010, Valenzano, Bari.*

### ABSTRACT

*Circovirus*, famiglia *Circoviridae*, è un virus privo di envelope, a DNA circolare a singolo filamento (Niagro et al., 1998). Il suo genoma codifica per due proteine principali, replication associated protein (Rep) e coat protein (CP). È inoltre presente la regione ORF (open reading frame), la cui funzione non è stata ancora ben definita (Varsani et al., 2010).

Nei pappagalli, questo virus è ben noto e viene definito BFDV (Beak and Feather Disease Virus), in quanto causa una patologia denominata Malattia del becco e delle penne (Psittacine Beak and Feather Disease - PBFD), in quanto caratterizzata da anomalie a carico del piumaggio e del becco (Gerlach, 1994). La rilevanza di questa patologia è legata alla immunodepressione che si osserva nei soggetti colpiti, dovuta a deplezione dei tessuti linfoidi, in particolare timo e borsa di Fabrizio, che li predispone a frequenti infezioni secondarie di natura batterica e/o fungina (Katoh et al., 2010; Todd, 2004). Nei pappagalli, l'infezione da *circovirus* è stata identificata in più di 60 differenti specie di psittacidi e si ritiene abbia distribuzione pressochè mondiale (Todd, 2004; Cathedral-Ortiz et al. 2010). Tra le altre specie di volatili, *Circovirus* è stato identificato nei canarini (Todd et al., 2001; Rampin et al., 2006), nei piccioni (Mankertz et al. 2000; Todd et al. 2001; Duchatel et al., 2006; Todd et al. 2008), negli struzzi (Shivaprasad et al. 1993; Eisenberg et al. 2003), nelle oche (Todd et al. 2001; Chen et al. 2003) nelle anatre (Smyth et al., 2005), nel corvo australiano (Stewart et al. 2006) e nel diamante di Gould (Shivaprasad et al., 2004; Circella et al. 2014). In queste specie, gli effetti dell'infezione non sono ancora ben chiari. Analogamente, le manifestazioni cliniche descritte possono variare da caso a caso, anche a seconda della specie colpita. In questo lavoro, viene riportato il riscontro di *circovirus* in una gru coronata (*Balearica regulorum*).

Tale stipite è stato identificato in un esemplare di gru coronata adulto, asintomatico, che si trovava in un giardino zoologico del Sud Italia. Nella stessa struttura, sia pure in voliere differenti, erano presenti pappagalli appartenenti a specie diverse. Il virus è stato identificato mediante PCR utilizzando due protocolli diversi, con due differenti coppie di primers, *BFDV2/4* (Ypelaar et al., 1999) e *DCiVf/r* (Todd et al., 2001). Le PCR hanno permesso di amplificare due frammenti, del peso molecolare atteso rispettivamente di 700 bp e 550 bp. L'analisi delle sequenze corrispondenti ai frammenti ottenuti hanno confermato l'identificazione di *circovirus*, che è stato denominato IT82. Il genoma completo del virus è stato poi amplificato e sequenziato per l'analisi filogenetica del virus identificato.

La sequenza ottenuta è stata comparata inizialmente con quelle corrispondenti ai genomi completi di *circovirus* identificati presso il Dipartimento di



Medicina Veterinaria in pappagalli appartenenti a specie differenti (tabella 1), e successivamente con le sequenze corrispondenti presenti in GenBank.

Dalla prima analisi sul genoma completo, IT82 identificato nell'esemplare di gru coronata ha mostrato un'identità nucleotidica del 96% con IT24, individuato nel cacatua e del 95,6% con IT60, riscontrato in un cenerino (tabella 2).

Rispetto a tutti i virus considerati, la sua distanza in termini di differenza percentuale della sequenza nucleotidica, è risultata compresa tra 4 % e 8,6 %.

Strettamente correlato in base alla sequenza nucleotidica ad IT24 ed IT60 (figura 1), IT82 presentava una sequenza ripetuta vicino all'ipotetica origine di replicazione più corta rispetto agli altri stipiti. Inoltre, IT82 condivideva con questi la sequenza ripetuta nella regione compresa tra i nucleotidi 1128 e 1164, ma presentava altre due sequenze ripetute nelle posizioni 1756-1767 e 1808-1795. Dalla comparazione tra la sequenza di IT82 e le sequenze, presenti in GenBank, corrispondenti a *circovirus* identificati in diversi Stati ed in pappagalli di specie diverse, è emerso che IT82 (gru coronata), così come IT24 del cacatua ed IT60 del cenerino, cui risultava strettamente correlato, rientravano in uno stesso *cluster* che comprendeva *circovirus* identificati in psittacidi, tra cui cenerini, parrocchetti dal collare (*P. krameri*), e due diverse varietà di rosella (*Platyercus*) in Polonia ed in Portogallo tra il 2008 ed il 2011 (Julian et al., 2013; Henriques et al., 2010).

In base ai criteri stabiliti da Fauquet et al. (2008) e Varsani et al. (2011), IT82 deve pertanto essere classificato come BFDV. Tale risultato è particolarmente significativo se si considera che la specie in cui è stato identificato, è molto distante filogeneticamente dall'ordine *Psittaciformes* (Hackett et al., 2008). L'infezione non ha avuto alcuna ripercussione sulla gru risultata infetta. Tuttavia essa assume rilevanza per la possibile trasmissione interspecifica dell'infezione. Infatti, la gru coronata infetta si trovava in un giardino zoologico dove erano presenti psittacidi, sia pure separati in quanto allevati in voliere diverse, ed è ipotizzabile, anche in base ai risultati delle analisi filogenetiche, che l'infezione riscontrata nella gru derivi dai pappagalli. Si ritiene infatti improbabile che il virus identificato nelle penne fosse una semplice contaminazione, in quanto l'estrazione di DNA è stata condotta dalla parte cellularizzata del calamo, separata accuratamente dal resto. Essendo *circovirus* stabile nell'ambiente (Todd, D. *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. Avian Pathology, 29, 373-394. 2000), è possibile che il virus sia passato dai pappagalli alla gru facilmente per via indiretta. I pappagalli presenti, che comunque non è stato possibile analizzare, non manifestavano alcuna sintomatologia. Questo è un fenomeno comunemente noto proprio negli psittacidi, in cui l'infezione può decorrere anche asintomaticamente in animali adulti, mentre induce lesioni e mortalità nei giovani. La gru, oltre ad essere un soggetto adulto, rappresenterebbe un ospite non preferenziale per il virus, che vi ha attecchito, ma non ha indotto manifestazioni cliniche riconducibili alla malattia del becco e delle penne.

In ogni caso, la gru potrebbe potenzialmente fungere a sua volta da serbatoio dell'infezione per i pappagalli. Questa possibilità assume particolare rilievo se si considera che la gru è, allo stato libero, un animale migratore che pertanto può veicolare il virus da un'area geografica all'altra, favorendo tra l'altro fenomeni di ricombinazione genetica tra virus insistenti in territori diversi.

## BIBLIOGRAFIA

**Cathedral-Ortiz, L., B. Kurenbach, M. Massaro, K. McInnes, D.H. Brunton, M.E. Hauber, D.P. Martin, and A. Varsani.** (2010). A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*) in New Zealand. *Archives of Virology*, 155, 613-620.

**Chen, C.L., P.C. Chang, M.S. Lee, J.H. Shein, S.J. Ou, and H.K. Shieh.** (2003). Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. *Avian Pathology*, 32, 165-171.

**Duchatel, J. P., D. Todd, J. A. Smyth, J.C. Bustin, and H. Vindevogel.** (2006). Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. *Avian Pathology*, 35, 30-34.

**Eisenberg, S.W.F., A.J.A.M. van Asten, A.M. van Ederen, and G.M. Dorrestein.** (2003). Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on farm in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 95, 27-38.

**Gerlach, H.** (1994). *Circoviridae - Psittacine Beak and Feather Disease Virus*, in: Ritchie, B.W., Harrison, J., Harrison, L.R. (Eds.). *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth. pp. 894-902.

**Henriques A.M., Fagulha T., Duarte M., Ramos F., Barros S., Luis T., Bernardino R., Feveireiro M.** (2010). Phylogenetic analysis of six isolates of beak and feather disease virus from African Grey Parrots in Portugal. *Avian Diseases*. 54: 1066-1071.

**Katoh, H., H. Ogawa, K. Ohya, and H. Fukushi.** (2010). A review of DNA viral infections in psittacine birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72, 1099-1106.

**Mankertz, A., K. Hattermann, B. Ehlers, and D. Soike.** (2000). Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Archives of Virology*, 145, 2469-2479.

**Niagro, F.D., A.N. Forsthoefel, R.P. Lawther, L. Kamalanathan, B.W. Ritchie, K.S. Latimer, and P.D. Lukert.** (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Archives of Virology*, 143, 1723-1744.

**Rampin, T., G. Manarolla, G. Pisoni, C. Recordati, and G. Sironi.** (2006). Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. *Avian Pathology*, 35, 277-279.

**Shivaprasad, H.L., H., Daphne, D. Todd, and J.A. Smyth.** (2004). Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Pathology*, 33, 525-529.

**Shivaprasad, H.L., P.W. Woolcock, A.E. Castro, R.P. Chin, R.W. Nordhausen, C.U. Meteyer, J.S. Jeffrey, B.C. Barr, and R. Droual.** (1993). Identification of viruses from the intestine of ostriches. *Proceedings of the 36th Annual Meeting*,

American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Las Vegas, NV, USA. p. 107.

**Smyth, J., D. Soike, D. Moffett, J.H. Weston, and D. Todd.** (2005). Circovirus-infected geese studies by in situ hybridation. *Avian Pathology*, 34, 227-232.

**Todd, D.** (2004). Avian circovirus diseases: lesson for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology*, 98, 169-174.

**Todd, D.** (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology*, 29, 373-394.

**Todd, D., E. Fringuelli, A.N. Scott, B.J. Borghmans, J.P. Duchatel, H.L. Shivaprasad S.R. Raidal, J.X. Abadie, M.P. Franciosini, and J.A. Smyth.** (2008). Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Research in Veterinary Science*, 84, 311- 319.

**Todd, D., J. Weston, N.W. Ball, B.J. Borghmans, J.A. Smyth, L. Gelmini, and A. Lavazza.** (2001). Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathology*, 30, 321-325.

**Varsani, A., G.K. de Villiers, G.L. Regnard, R.R. Bragg, K. Kondiah, I.I. Hitzeroth, and E.P. Rybicki.** (2010). A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Archives of Virology*, 155, 435-439.

**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. *Veterinary Microbiology*. 68(1-2): 141-148.

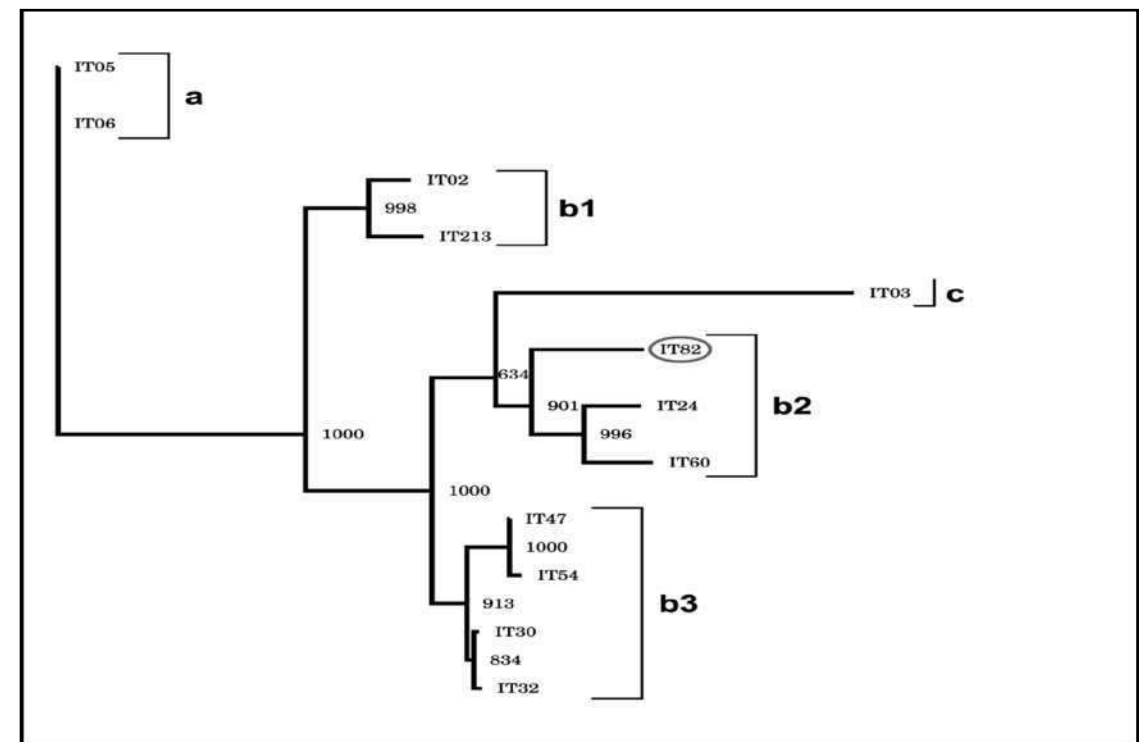
**Tabella 1:** Distanze percentuali tra i virus analizzati

Virus	Specie
IT02	Conuro del sole ( <i>Aratinga solstitialis</i> )
IT03	Pappagallino ondulato ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )
IT05	Inseparabile collo rosa ( <i>Agapornis roseicollis</i> )
IT06	Inseparabile collo rosa ( <i>Agapornis roseicollis</i> )
IT24	Cacatua bianco ( <i>Cacatua alba</i> )
IT30	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )
IT32	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )
IT47	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )
IT54	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )
IT60	Cenerino ( <i>Psittacus erithacus</i> )
IT213	Inseparabile collo rosa ( <i>Agapornis roseicollis</i> )

**Tabella 2:** Distanze percentuali tra i virus analizzati

	IT02	IT03	IT05	IT06	IT213	IT24	IT30	IT32	IT47	IT54	IT60
IT03	8,5										
IT05	6,4	10,3									
IT06	6,4	10,3	0								
IT213	1,9	8,8	6,6	6,6							
IT24	7,9	8,2	9,3	9,3	8,0						
IT30	5,1	8,0	7,3	7,3	5,2	4,4					
IT32	5,0	7,9	7,1	7,1	5,1	4,5	0,3				
IT47	5,2	8,4	7,4	7,4	5,4	5,2	1,1	1,2			
IT54	5,5	8,6	7,5	7,5	5,6	5,3	1,3	1,4	0,3		
IT60	7,9	8,0	9,1	9,1	8,0	2,5	4,6	4,7	5,1	5,3	
IT82	7,6	8,4	8,6	8,6	7,8	4,0	4,6	4,7	5,2	5,4	4,4

**Figura 1:** Albero filogenetico dei virus oggetto di questo studio.



## ISOLAMENTO DI *SALMONELLA* INFANTIS IN RONDONI (*APUS APUS*) NELLA CITTÀ DI NAPOLI

Dipineto L.<sup>1</sup>, Borrelli L.<sup>1</sup>, Russo T. P.<sup>1</sup>, De Luca Bossa L.M.<sup>2</sup>, Caputo V.<sup>2</sup>, Gargiulo A.<sup>1</sup>, Barco L.<sup>3</sup>, Menna L. F.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II

<sup>2</sup> Centro di Riferimento Regionale per l'Igiene Urbana Veterinaria (CRIUV), Napoli, Italy

<sup>3</sup> Centro di Riferenza Nazionale per le Salmonellosi, IZSVE, Padova

### Summary

Forty common swifts (*Apus apus*), synanthropic birds living in an urban environment closely with humans and other animals, were hospitalized in the public veterinary hospital of the Regional Reference Center of Urban Veterinary Hygiene located in Naples, Campania Region, Italy. Each bird was sampled for bacteriological analyses. Out of 40 common swifts examined, eight were found positive for *Salmonella enterica* serovar Infantis although no sign of salmonellosis (e.g. diarrhoea) was shown. Our results suggest this avian species as a novel potential reservoir for one of most important *Salmonella* serovars.

### INTRODUZIONE

Il rondone è un volatile sinantropico la cui dieta è rappresentata principalmente da artropodi. E' considerato un migratore transahariano o *long distance migrants* la cui popolazione si muove regolarmente dall'Africa sub-sahariana all'Europa per la riproduzione (2). Alle nostre latitudini (Napoli, 40°50'0" N, 14°15'0" E), il rondone arriva in primavera per trascorrere circa 4 mesi. In virtù di queste caratteristiche i rondoni sono stati spesso utilizzati come bioindicatori di contaminanti organici. Tuttavia, non sono disponibili studi sulla presenza di agenti zoonotici in questa specie di volatile eccetto l'isolamento di *Erysipelothrix rhusiopathiae* come agente causale della morte di una colonia di rondoni minori (*Apus affinis*) (4). Il presente studio riporta l'isolamento di *Salmonella enterica* serovar Infantis da rondoni ospitati presso il Centro di Riferimento Regionale per l'Igiene Urbana Veterinaria (CRIUV) di Napoli.

### MATERIALI E METODI

#### Campionamento

Durante il periodo Aprile/Agosto 2011, venivano accolti presso il CRIUV di Napoli 40 rondoni suddivisi in 24 adulti e 16 giovani. L'età veniva stabilita a seguito della valutazione del piumaggio e della misurazione dell'apertura alare (38-40 cm negli adulti). I volatili, inabili al volo e ritrovati al suolo in varie aree della città di Napoli, venivano portati al CRIUV da privati. La maggior parte dei rondoni presentava lesioni traumatiche, debilitazione ed inedia. Prima di procedere alla diagnosi e alla terapia, ogni uccello veniva campionato mediante tamponi cloacali per le indagini microbiologiche, in particolare per l'isolamento di *Salmonella* spp.

#### Isolamento, identificazione, antibiotico-resistenza

Ciascun tampone cloacale veniva inoculato in buffered peptone water (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) ed incubato a 37° C per 18 ore. Le brodocolture venivano, poi, inoculate in Rappaport-Vassiliadis Broth (Oxoid Ltd.) ed incubate a 42° C per 24 ore. Successivamente, si procedeva alla semina su Xylose-Lysine-Deoxycholate Agar (Oxoid Ltd) e su Brilliant Green Agar (Oxoid Ltd) con incubazione a 37° C per 24 ore. Le colonie "sospette" venivano identificate biochimicamente con il sistema miniaturizzato API20-E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Gli isolati di *Salmonella* spp. venivano, poi, sierotipizzati secondo lo schema di Kauffman-White e sottoposti a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in collaborazione con il Centro di Riferenza Nazionale per le Salmonellosi (IZSVE, Legnaro, Italy). Tutti gli isolati venivano, inoltre, sottoposti al test per l'antibiotico-resistenza mediante il metodo della diffusione da disco su agar utilizzando i seguenti antibiotici: ampicillina (10 mg), cloramfenicolo (30 mg), streptomina (10 mg), sulfonamide (300 mg), tetraciclina (30 mg), cefotaxime (30 mg), gentamicina (10 mg), kanamicina (30 mg), sulfametossazolo-trimethoprim (23,75/1,25 mg), acido nalidixico (30 mg), ciprofloxacina (5 mg).

### RISULTATI

*Salmonella* spp. veniva isolata da 8/40 (20,0%; 95% intervallo di confidenza: 9,6 – 36,1%) campioni esaminati e venivano sierotipizzati come *S. enterica* serovar Infantis. Tale positività veniva riscontrata esclusivamente in volatili adulti. Di questi, cinque provenivano da volatili ritrovati nel centro della città di Napoli mentre i rimanenti da aree suburbane. Alla PFGE i ceppi di *S. Infantis* condividevano un profilo indistinguibile XbaI-PFGE (coefficiente di Dice = 100%). Per quel che concerne il test di antibiotico-resistenza, i ceppi di *S. Infantis* isolati mostravano antibiotico-sensibilità multipla. In particolare, tutti gli isolati erano sensibili a streptomina, sulfonamide, tetraciclina, cefotaxime, gentamicina, kanamicina, ciprofloxacina, enrofloxacina, acido nalidixico ma resistenti ad ampicillina e sulfametossazolo-trimethoprim.

### DISCUSSIONE

*S. Infantis* è causa di salmonellosi umana in varie parti del mondo e rappresenta il terzo sierotipo di *Salmonella* maggiormente isolato in Europa, preceduto da *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (1). Risulta difficile formulare delle ipotesi sulle fonti e modalità di infezione dei rondoni con *S. Infantis* poiché è impossibile risalire all'anamnesi durante i periodi di permanenza nell'Africa centrale e meridionale. Una possibile fonte di infezione potrebbe essere rappresentata da alcuni insetti (e.g. *Musca domestic*, Culicidae) che fungono da risorsa alimentare per questi uccelli. Infatti, uno studio condotto da Olsen et al. (3) riporta l'isolamento di *S. Infantis* dalla mosca domestica e da altri ditteri. L'antibiotico-resistenza, per quel che concerne il nostro studio, non sembrerebbe essere un problema di particolare rilievo in quanto i ceppi di *S. Infantis* isolati hanno manifestato basse percentuali di antibiotico-resistenza. Inoltre, gli otto isolati presentavano un profilo di restrizione indistinguibile XbaI-PFGE suggerendone la appartenenza ad uno stesso clone.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati, quindi, confermano il ruolo degli uccelli selvatici nella diffusione di agenti patogeni ed indicano il rondone come un possibile diffusore di agenti zoonotici (i.e. *Salmonella* spp.) durante gli spostamenti migratori ma anche quando staziona in ambiente urbano.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dionisi AM, Lucarelli C, Benedetti I, Owczarek S and I Luzzi. (2011). Molecular characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Infantis from humans, animals and the environment in Italy. Int. J. Antimicrob. Agents. 38:384-389.
2. Miniero R, Carere C, De Felip E, Iacovella N, Rodriguez F, Alleva E and A di Domenico. (2008). The use of common swift (*Apus apus*), an aerial feeder bird, as a bioindicator of persistent organic microcontaminants. Ann. Ist. Super. Sanita. 44:187-194.
3. Olsen AR and TS Hammack. (2000). Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. J. Food Prot. 63:958-960.
4. Van Vuuren M and JM Brown. (1990). Septicaemic *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in the Little Swift (*Apus affinis*). J S Afr Vet Assoc. 61:170-171.

## PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER* SPP. IN RAPACI DIURNI E NOTTURNI

Dipineto L.<sup>1</sup>, De Luca Bossa L. M.<sup>2</sup>, Russo T. P.<sup>1</sup>, Ciccarelli F.<sup>3</sup>, Borrelli L.<sup>1</sup>, Raia P.<sup>3</sup>, Santaniello A.<sup>1</sup>, Menna L. F.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II

<sup>2</sup> Centro di Riferimento Regionale per l'igiene Urbana Veterinaria (CRIUV), Napoli, Italy

<sup>3</sup> Centro Recupero Animali Selvatici "CRAS-Frullone"

### Summary

A total of 170 birds of prey admitted to two Wildlife Rescue and Rehabilitation Centers of Italy were examined. Birds were subdivided in diurnal ( $n=15$ ) and nocturnal ( $n=7$ ) species, sampled by cloacal swabs and examined for *Campylobacter* spp. by cultural and molecular methods. *Campylobacter* spp. was isolated in 43 out of the 170 (25.3%) birds of prey examined. Among these, 43/43 (100%) were identified as *C. jejuni* and 10/43 (23.3%) were identified as *C. coli* recovered from mixed infections. Diurnal birds of prey showed a significantly higher prevalence value ( $P = 0.0006$ ) for *Campylobacter* spp. than nocturnal birds of prey.

### INTRODUZIONE

I *Campylobacter* termotolleranti, in particolare *C. jejuni* e *C. coli*, sono tra i principali agenti batterici causa di gastroenterite umana nei paesi industrializzati (3). Varie specie di volatili rappresentano il principale reservoir (1); tuttavia, i dati disponibili in letteratura sulla prevalenza di *Campylobacter* spp. nei rapaci è scarsa e frammentaria. Questi volatili possono essere ritrovati in prossimità degli habitat occupati dall'uomo ed in prossimità di campi agricoli favorendo, in tal modo, l'eventuale trasmissione di agenti patogeni all'uomo e al comparto zootecnico. Alla luce di quanto esposto, quindi, il presente studio è stato condotto con lo scopo di valutare la prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nei rapaci.

### MATERIALI E METODI

#### Campionamento

Durante il periodo Gennaio 2011/Novembre 2012, venivano esaminati 170 rapaci presso due Centri di Recupero per Animali Selvatici (CRAS). In particolare, venivano analizzati 84/170 rapaci presso il CRAS della regione Lazio e 86/170 rapaci presso il CRAS della regione Campania. I volatili appartenevano a differenti specie ed in virtù della loro diversa attività predatoria venivano suddivisi in specie diurne ( $n=15$ ) e specie notturne ( $n=7$ ). Nello specifico, venivano raccolti tamponi cloacali da 84/170 rapaci diurni e da 86/170 rapaci notturni. Il campionamento veniva condotto, per la maggior parte dei volatili, al momento del ricovero e prima della somministrazione delle eventuali terapie.

#### Isolamento e identificazione

I campioni venivano inoculati in *Campylobacter*-selective enrichment broth (Oxoid)

ed incubati a 42°C per 48 ore in ambiente microaerofilo. Successivamente, si procedeva alla semina su *Campylobacter* blood-free selective agar (Oxoid) che veniva incubato a 42° C per 48 ore sempre in microaerofilia. Le colonie “sospette” venivano osservate al microscopio ottico, subcoltivate su sheep blood agar (Oxoid), incubate per 24 ore a 42° C e sottoposte a multiplex PCR seguendo le procedure descritte da Gargiulo *et al.* (2).

#### Analisi statistica

I dati relativi ai rapaci (diurni *versus* notturni) venivano analizzati mediante analisi statistica univariata (test del chi-quadro per l'indipendenza) usando lo status di *C. jejuni* (positivo/negativo) come variabile dipendente. L'analisi statistica era condotta mediante il software SPSS 13 per Windows.

#### RISULTATI

Dei 170 rapaci esaminati, 43 (25.3%; 95% intervallo di confidenza (IC) = 19.1–32.6%) risultavano positivi a *Campylobacter* spp. Alla PCR, *C. jejuni* veniva identificato in 43/43 (100%) campioni positivi e, tra questi, 10/43 (23.3%) venivano identificati anche come *C. coli*. I rapaci diurni mostravano una prevalenza del 36.9% (95% IC = 26.8–48.2%), mentre quelli notturni mostravano una prevalenza del 13.9% (95% IC = 7.7–23.5%); questa differenza appariva statisticamente significativa ( $P = 0.0006$ ).

#### DISCUSSIONE

E' noto che gli uccelli selvatici sono reservoir naturali di *Campylobacter* spp. Tuttavia, studi sulla prevalenza di questo microrganismo nei rapaci sono limitati. Uno studio condotto in Svezia da Palmgren *et al.* (5) riportava la presenza di *Campylobacter* spp. da 69 falchi pellegrini con una prevalenza del 9%. Risultati analoghi venivano evidenziati in un recente studio condotto in Spagna (Molina-Lopez *et al.* (4) in cui *Campylobacter* spp. veniva isolato da 121 rapaci con una prevalenza del 7%. Inoltre, uno studio condotto su 52 rapaci in Croazia da Vlahovic *et al.* (7) riportava risultati costantemente negativi. Nel nostro studio, invece, *Campylobacter* spp. veniva isolato da un alto numero di rapaci con una prevalenza del 25,3%. Queste variazioni di prevalenza potrebbero essere dovute alle diverse procedure di isolamento e ai differenti fattori urbani, climatici ed ambientali coinvolti. Degno di nota, i rapaci diurni manifestavano una positività per *C. jejuni* con una prevalenza significativamente più alta rispetto ai rapaci notturni. Non è stato possibile indagare su questa differenza di prevalenza. Probabilmente, ciò è stato influenzato dalle differenti abitudini predatorie ed alimentari fra questi due gruppi di rapaci. Infatti, la dieta di questi volatili è rappresentata principalmente da piccoli mammiferi, roditori, invertebrati ed altri uccelli i quali, come noto, sono i principali serbatoi di *Campylobacter* spp. e vengono predati dai rapaci diurni in misura maggiore rispetto ai rapaci notturni (8). Inoltre, questa differenza di prevalenza potrebbe essere legata anche alla maggiore mobilità dei rapaci diurni rispetto a quelli notturni.

#### CONCLUSIONI

I nostri risultati sottolineano l'alta prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nei rapaci e, come anche riportato da Sippy *et al.* (6), poichè questi volatili vivono in ambiente selvatico potrebbero contaminare l'ambiente con le loro feci e diffondere il patogeno al pollame, al comparto zootecnico nonché ai CRAS in cui vengono accolti.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Dipineto L, Gargiulo A, De Luca Bossa LM, Rinaldi L, Borrelli L, Menna LF and A Fioretti. (2008). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in pheasants (*Phasianus colchicus*). *Avian Pathol.* 37:507-508.
2. Gargiulo A, Rinaldi L, D'Angelo L, Dipineto L, Borrelli L, Fioretti A and LF Menna. (2008). Survey of *Campylobacter jejuni* in stray cats in southern Italy. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:267-270.
3. Humphrey T, O'Brien S and M Madsen. (2007). *Campylobacter*s as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117:237–257.
4. Molina-Lopez RA, Valverdú N, Martin M, Mateu E, Obon E, Cerdà-Cuéllar M and L Darwich. (2011). Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains. *Vet. Rec.* 168:565.
5. Palmgren H, Broman T, Waldenström J, Lindberg P, Aspán A and B Olsen. (2004). *Salmonella* Amager, *Campylobacter jejuni*, and urease-positive thermophilic *Campylobacter* found in free-flying peregrine falcons (*Falco peregrinus*) in Sweden. *J. Wildl. Dis.* 40:583-587.
6. Sippy R, Sandoval-Green CM, Sahin O, Plummer P, Fairbanks WS, Zhang Q and JA Blanchong. (2012). Occurrence and molecular analysis of *Campylobacter* in wildlife on livestock farms. *Vet. Microbiol.* 157:369-375.
7. Vlahović K, Matica B, Bata I, Pavlak M, Pavičić Ž, Popović M, Nejedli S and A Dovc. (2004). *Campylobacter*, salmonella and chlamydia in free-living birds of Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* 50:127-132.
8. Whitacre DF. (2012). Neotropical Birds of Prey: Biology and Ecology of a Forest Raptor Community. Cornell University Press, New York. 412 p.

## PFGE E MALDI TOF A CONFRONTO NELLO STUDIO DELLA SPONDILITE DA *ENTEROCOCCUS CECORUM* DEL BROILER

Drigo I., Pascoletti S., Bacchin C., Berto G., Brunetta R., Agnoletti F., Viel L., Guolo A., Marcon B., Bano L.

Laboratorio di Batteriologia Speciale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Villorba, Treviso

### Summary

*Enterococcus cecorum* has recently emerged as an important cause of osteomyelitis in chickens. 27 *Enterococcus cecorum* strains isolated from meat chickens, 3 from laying hens, 2 from calves and 1 from duck were characterized by PFGE and MALDI TOF MS. PFGE results revealed that clinical strains isolated from the same flock and the same bird were clonal or genetically strongly related. The PFGE showed a higher discriminating power compared with the MALDI TOF.

### INTRODUZIONE

*Enterococcus cecorum* (inizialmente conosciuto come *Streptococcus cecorum*) è un cocco Gram positivo anaerobio facoltativo, catalasi negativo e  $\alpha$ -emolitico. Sebbene *E. cecorum* sia un normale commensale della flora intestinale degli uccelli, è considerato un patogeno emergente del pollo da carne in quanto è stato associato a spondilite, osteomielite, artriti e setticemia. La spondilite è un'infiammazione vertebrale che è stata osservata soprattutto in soggetti maschi di età superiore a 28 gg, con mortalità che ha toccato anche il 15% in alcuni gruppi (Martin *et al.*, 2011). L'esatta modalità di trasmissione e i fattori di virulenza correlati a questo tipo di infezione non sono ancora noti quindi un'appropriate sorveglianza per mezzo di strumenti biomolecolari è necessaria per comprenderne meglio l'epidemiologia di questo microorganismo. Vari metodi biomolecolari sono stati utilizzati per tipizzare e caratterizzare geneticamente gli enterococchi, tra questi: ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR e PFGE (pulsed field gel electrophoresis) che è considerata il "gold standard" per la tipizzazione di numerose specie batteriche (Wijetunge *et al.*, 2012). Negli ultimi 10 anni la spettrometria di massa è divenuta un importante strumento d'indagine nei laboratori di microbiologia sia per l'identificazione batterica che per la sub-tipizzazione, come dimostrano i recenti lavori pubblicati su MRSA, *C. difficile* e *Legionella* (Wolters *et al.*, 2011; Reil *et al.*, 2011). Nel presente studio la PFGE e la spettrometria di massa sono state utilizzate per valutare le correlazioni epidemiologiche di ceppi di *E. cecorum* coinvolti in episodi di spondilite del pollo da carne.

### MATERIALI E METODI

#### Ceppi batterici

I ceppi batterici sono stati isolati tra il 2010 ed il 2014 e identificati mediante sistema miniaturizzato API RAPID ID 32 Strep (BioMérieux) o MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) e conservati in criovials a -80 °C. In totale sono stati inclusi nello studio 34 ceppi di *E. cecorum* di cui 27 isolati da 16 gruppi di boiler commerciali. Tra questi gruppi, 9 presentavano le classiche lesioni all'apparato

scheletrico riferibili a spondilite ed erano tutti ibridi Ross (6 gruppi Ross-708 e 3 gruppi Ross-308) mentre gli altri ceppi erano stati isolati da sierose o organi parenchimatosi (fegato, milza, pericardio, sacco aereo). Nello studio sono stati inclusi anche 4 ceppi di *E. cecorum* isolati da ovaioia, 1 da anatra e 2 da bovino.

#### Pulsed field gel electrophoresis

Il DNA genomico è stato estratto come descritto da Luey *et al.*, (2007) con alcune modifiche. Una singola colonia di ciascun ceppo di *E. cecorum* è stata risospesa in 5 ml di Brain Heart Infusion Broth (BHI) ed incubata in bagnetto termostato a 37 °C per 24 h, in leggera agitazione. La coltura batterica è stata successivamente portata alla densità di 5-10 McFarland e 500  $\mu$ l di tale sospensione sono stati centrifugati. Il pellet è stato risospeso in 500  $\mu$ l di TE Buffer (10mM tris-HCl, 1mM di EDTA, pH 8,0), addizionato di 1,6  $\mu$ g/ml di lisostafina e di 1 mg/ml di lisozima. Dopo incubazione a 37°C per 10 minuti alla sospensione batterica è stata aggiunta la Proteinasi K alla concentrazione finale di 330  $\mu$ g/ml e 500  $\mu$ l di SeaKem Gold Agarose (Biospa) all'1,2% ed è stata colata negli appositi plug-molds. Le plugs sono quindi state sottoposte a lisi per 1 ora a 55 °C in ES buffer (0,5 M EDTA pH 8,0, 1% sarkosyl) contenente 0,5 mg/ml di proteinasi K. Dopo due lavaggi con acqua per biologia molecolare e 4 lavaggi con TE buffer le plugs sono state sottoposte a restrizione enzimatica con 60 U/campione di *smal*. I frammenti di DNA sono stati separati attraverso elettroforesi in SeaKem Gold Agarose (Biospa) all'1% utilizzando lo strumento CHEF Mapper (Biorad). In ciascuna corsa è stato utilizzato come controllo dell'elettroforesi un ceppo di *Salmonella braenderup* H9812 ristretta con l'enzima XbaI.

I parametri di corsa sono stati i seguenti: switch time da 2 a 5 sec a 6V/cm per 6,5 ore alla temperatura controllata di 14 °C seguito da 13,5 ore di corsa con uno switch time da 20 a 40 secondi sempre a 14 °C. I fingerprint patterns sono stati analizzati utilizzando il software Bionumerics 7.1 (Applied Maths), la similarità è stata calcolata usando il Dice coefficient e come algoritmo di clustering è stato utilizzato l'UPGMA. Per l'elaborazione delle immagini l'ottimizzazione e la tolleranza sono stati impostati all'1%.

#### MALDI-TOF

I ceppi sono stati coltivati in Columbia agar (Oxoid) a 37 °C in condizioni di microaerofilia per 24 ore. I campioni sono stati quindi risospesi in 500  $\mu$ l di acqua ultrapura e le proteine sono state estratte mediante l'utilizzo di acido formico al 70% e aceto nitrile. L'estratto proteico è stato quindi analizzato in 6 repliche utilizzando lo strumento Microflex LT (Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati acquisiti automaticamente in linear positive mode in un range da 2000 a 20000 m/z. Per la ionizzazione delle proteine batteriche è stata utilizzata come matrice una soluzione satura di HCCA ( $\alpha$ -Ciano-4-idrossycinnamic acid) in 50% di aceto nitrile e 2,5% di acido trifluoroacetico come da indicazioni del produttore. Gli spettri così ottenuti sono stati quindi importati nel software Bionumerics 7.1 (Applied Maths). La similarità degli spettri è stata calcolata usando il curve-based Pearson correlation coefficient e come algoritmo di clustering l'UPGMA sono state prese in considerazione solo le repliche con più del 95% di similarità.

## RISULTATI

### *Pulsed field gel electrophoresis*

Nell'albero filogenetico ottenuto è stato possibile individuare 6 cluster (similarità > 80%). In un cluster si sono disposti i ceppi di origine bovina che hanno presentato la maggiore lontananza genetica dai ceppi di origine aviaria. Tre ceppi isolati da ovaiaola si sono collocati in un secondo cluster mentre il 4° ceppo da ovaiaola ha presentato una similarità < 80% con tutti i ceppi inclusi nell'indagine. La maggiore vicinanza genetica (> 90%) è stata osservata tra i ceppi isolati da soggetti di uno stesso gruppo, o da distretti diversi di uno stesso soggetto. In 6 di questi casi i ceppi hanno mostrato clonalità (similarità > 95%).

### *MALDI TOF*

Per ciascun ceppo le varie repliche hanno dato origine a spettri sostanzialmente simili tra loro, con l'esclusione mediamente di 1 solo profilo outlier per ceppo. In totale l'elaborazione è stata eseguita su 150 profili spettrometrici.

Tutti i ceppi isolati da casi di spondilite hanno mostrato tra loro un'elevata similarità collocandosi in un unico cluster (similarità > 82%). I ceppi isolati da altre specie animali (bovini, anatre) o categorie produttive (ovaiole) hanno mostrato una similarità < 82% con quelli implicati in episodi di spondilite del broiler.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In molteplici studi la PFGE è stata utilizzata per caratterizzare ceppi di *E. cecorum* responsabili della spondilite del broiler. Tuttavia le conclusioni di tali studi risultano contrastanti in merito alla possibile clonalità dei ceppi isolati da lesioni ossee di animali di uno stesso gruppo (Kense and Landman, 2011; Wijetunge *et al.* 2012; Borst *et al.* 2012; Boerlin *et al.* 2012). I risultati della PFGE emersi nel presente studio dimostrano una sostanziale clonalità tra i ceppi isolati da soggetti diversi di uno stesso gruppo e da distretti diversi di uno stesso soggetto, siano essi organi parenchimatosi, sierose o tessuti ossei. Dato che la sintomatologia compare pressoché simultaneamente in un numero considerevole di soggetti che raggiungono lo stesso peso, è lecito ritenere che la diffusione non avvenga con le modalità di trasmissione che caratterizzano una comune malattia infettiva non epidemica, la quale si diffonde lentamente e inesorabilmente nel gruppo. A supportare questa ipotesi vi è l'evidenza che il tipo di lesione che caratterizza la spondilite del broiler è da considerarsi "cronica" in quanto prevede una riorganizzazione dei tessuti in preda ad osteonecrosi e la costituzione di una spessa capsula fibrosa esterna. Il fatto che lo stesso clone di *E. cecorum* sia stato inglobato contemporaneamente in distretti ossei diversi dello stesso animale, consente di sospettare che l'infezione sia il frutto di una localizzazione precoce, forse risalente addirittura alla fase di pulcino. Si sa che il sistema immunitario dell'ospite è scarsamente efficace nei tessuti ossei, così come la diffusione degli antibatterici in questi distretti. Questo potrebbe aver causato la persistenza e l'attività osteolitica degli enterococchi, con la formazione di tessuto anomalo non in grado di sostenere gli elevati pesi raggiunti in tempi sempre più rapidi dalle genetiche moderne.

La spettrometria di massa applicata all'identificazione batterica (MALDI Biotyper) si basa sulla rilevazione di fingerprint proteici, collegati alla definizione di "specie", come quelli ribosomiali. Al contrario, i metodi di sub-tipizzazioni batterica classi-

ci (es. sierotipizzazione) si basano sulla caratterizzazione di antigeni di membrana che possono avere diversa natura (lipopolisaccaridi, proteine, glucidi ecc.). Questo potrebbe spiegare perché i risultati di discriminazione del MALDI TOF si siano dimostrati meno performanti rispetto a quelli della PFGE, sebbene abbiano consentito di collocare tutti i ceppi isolati da episodi di spondilite vertebrale in un cluster unico (similarità > 82%). Al contrario, i ceppi isolati da altre specie (bovino, anatra) o categorie produttive (ovaiole), risultano al di fuori di tale cluster, lasciando ipotizzare un adattamento di specie e categoria produttiva dei ceppi di *E. cecorum*.

## BIBLIOGRAFIA

Boerlin P, Nicholson V, Brash M, Slavic D, Boyen F, Sanei B, Butaye P. (2012). Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens. *Veterinary Microbiology* 157: 405–411.

Borst LB, Suyemoto MM, Robbins KM, Lyman RL, Martin MP, Barnes HJ. (2012). Molecular epidemiology of *Enterococcus cecorum* isolates recovered from enterococcal spondylitis outbreaks in the southeastern United States. *Avian Pathol.* 41(5): 479-485.

Kense MJ, Landman WJM. (2011). *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *Avian Pathol.* 40(6), 603-612.

Martin LT., Martin PM. , Barnes HJ. (2011). Experimental Reproduction of Enterococcal Spondylitis in Male Broiler Breeder Chickens. *Avian Disease* 55: 273–278.

Luey CK, Chu YW, Cheung TK, Law CC, Chu MY, Cheung DT, Kam KM. (2007). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Streptococcus suis* serotype 2. *J Microbiol Methods*, 68(3):648-50.

Reil M, Erhard M, Kuijper EJ, Kist M, Zaiss H, Witte W, Gruber H, Borgmann S. (2011). Recognition of *Clostridium difficile* PCR-ribotypes 001, 027 and 126/078 using an extended MALDI-TOF MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 30(11):1431-6.

Wijetunge DS, Dunn P, Wallner-Pendleton E, Lintner V, Lu H, Kariyawasam S. (2012). Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. *J Vet. Diagn. Invest.*, 24(6):1166-71.

Wolters M1, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 2011, 301(1):64-8.

## APPROFONDIMENTI DIAGNOSTICI SU CASI DI PROVENTRICOLITE IN POLLI DA CARNE

Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Casadio M., Massi P.

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna -

### Summary

A proventriculitis syndrome (associated to a malabsorption syndrome) in a multi age organic broiler farm was observed. Clinical signs and gross lesions were detected between 19 and 38 days of age. The same symptoms and lesions were also observed in the previous production cycle. In younger groups (19 and 24 days of age), the enteric lesions were most prominent and Reovirus and Rotavirus were observed using Electron Microscopy. At 31 and 38 days of age proventriculitis lesions were more evident. At 31 days of age the PCR and the RT-PCR revealed an infection caused by fowl adenovirus serotype 2 (in liver and intestine) and Enterovirus-like particles were observed by Electron Microscopy. At 38 days of age a mixed infection caused by Fowl Adenovirus serotype 2 (FAV2), in the proventriculus, intestine and liver and Reovirus, in the intestine, was detected using PCR and RT-PCR. Other viruses (such as Birnavirus, Infectious Bronchitis Virus, Chicken Infectious Anemia Virus and Infectious Bursal Disease), bacterial infections and mycotoxins were not involved in the observed cases

### INTRODUZIONE

Con il termine Proventricolite si intende un processo infiammatorio caratterizzato da dilatazione ed ispessimento della parete dello stomaco ghiandolare. Tale lesione viene spesso osservata nel quadro di sindromi da malassorbimento. Numerosi agenti infettivi (Adenovirus, Reovirus, Virus della Bronchite Infettiva e della Bursite infettiva) e non infettivi (amine biogene, micotossine, basso contenuto di fibra alimentare o eccesso di solfato di rame), sono stati associati a questa sindrome, tuttavia, nessuna tra queste cause è stata costantemente messa in rilievo nel determinismo delle lesioni al proventriglio. Scopo del presente lavoro è descrivere un percorso diagnostico applicato ad un caso di sindrome da malassorbimento e grave Proventricolite osservata in un allevamento di Broiler.

### MATERIALI E METODI

Nel mese di marzo 2014 sono stati conferiti presso la Sezione diagnostica di Forlì dell'IZSLER, 40 polli da carne (Ross 708) in parte morti e in parte soppressi in allevamento, distinti in quattro sub-campioni da 10 soggetti ciascuno di diverse età, (19 giorni, 24 giorni, 31 giorni e 38 giorni) per i quali il veterinario aziendale riferiva mortalità (4%) e formazione di scarti (10%) soprattutto nei soggetti di età compresa tra i 15 e 30 giorni di vita. Veniva inoltre segnalato un calo medio del peso vivo alla macellazione del 10% rispetto alla norma ed un peggioramento della qualità della lettiera. Gli animali risultavano vaccinati in incubatoio per Malattia di Marek, Malattia di Gumboro, Malattia di NewCastle e Bronchite Infettiva. Unico trattamento con Tilosina tra i 7 e 10 giorni di vita. Un percorso diagnostico era stato avviato tra dicembre e gennaio su animali di 20 e 40 giorni di vita, provenienti dalla stessa azienda, con dati produttivi e andamento clinico sovrapponibili.

**Tipologia di allevamento:** azienda organizzata in tre capannoni a ventilazione naturale, ciascuno di 1000 m<sup>2</sup>; l'interno del capannone suddiviso in "capannine" nelle quali vengono allevati i Broiler linea Bio OGM Free; nello stesso capannone, all'interno di capannine dedicate, sono allevati anche piccoli gruppi di faraone. Ogni capannina contiene 600 femmine, gli accasamenti vengono effettuati con frequenza settimanale. Il vuoto sanitario viene inteso per capannina, così come avviene per gli accasamenti. La macellazione avviene tra i 35 e 40 giorni.

### Indagini di laboratorio

- Esami anatomo-patologici
- Esami batteriologici
- Indagini biomolecolari

I campioni di proventriglio intestino e fegato sono stati sottoposti alle seguenti PCR specifiche per Reovirus, Fowl Adenovirus (FAV) e Birnavirus:

- Ricerca di Fowl Adenovirus (FAV): è stata eseguita una PCR che amplifica un frammento di 114bp dell'ORF20A del genoma di fowl adenovirus secondo il protocollo previsto da Romanova et al., 2009 con le seguenti modifiche: il DNA è stato amplificato allestendo la mix di reazione in 25µl totali contenenti: 250nM di ogni primer (forward 5'-ATGGTGTCTATTGGACGCA-3', reverse 5'-TGTTTGGATGTTGCACCTTT-3'), 12,5µl di GoTaq Hot Start Colorless Master mix (Promega) e 5 µl di DNA estratto. Profilo di amplificazione: attivazione TaqHot start 95°C per 2 minuti seguita da 35 cicli a 95°C per 45 secondi, 52°C per 45 secondi e 72°C per 45 secondi con estensione finale a 72°C per 5 minuti.
- Ricerca di Reovirus: è stata eseguita una RT-PCR secondo il protocollo previsto da Pantin-Jackwood et al., 2008. La reazione di RT-PCR, è stata allestita utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®), e primer specifici per una porzione di 1120 bp del gene S4. In particolare, in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 1µM di ogni primer (S4-F13 5'-GTGCGTGTGGAGTTTCCCG-3', S4-R1133 5'-TACGCCATCCTAGCTGGA-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), 40 X (94°C, 30 sec; 50°C, 30sec, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 10 min).
- Ricerca di Birnavirus: è stata eseguita una RT-PCR che amplifica un frammento di 170bp del gene VP1 (Guy et al, 2011). La retrotrascrizione è stata eseguita mediante kit Affinity Script Multiple Temperature c-DNA Synthesis kit (Stratagene) secondo le indicazioni della ditta produttrice. Il cDNA è stato poi amplificato allestendo la mix di reazione in 25µl totali contenenti: 500nM di ogni primer (B2F 5'-CGTAGACCTCGTCCTTCTGC-3', B2R 5'-GGGCGTAACCATTCAGATA-3'), 12,5µl di GoTaq Hot Start Colorless Master mix (Promega) e 5 µl di cDNA. Profilo di amplificazione: attivazione TaqHot start 95°C per 2 minuti seguita da 40 cicli a 95°C per 45 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per 1 minuto con estensione finale a 72°C per 7 minuti.



- Microscopia elettronica ME (colorazione negativa, tecnica ultracentrifugazione)
- Sequenziamento genico

I prodotti PCR ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers dell'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye Terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500xl (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASStar) e sottoposte a ricerca blast. Le sequenze sono poi state confrontate tra loro e con sequenze di riferimento disponibili in GenBank mediante allineamento multiplo e successiva costruzione di un dendrogramma con il metodo Neighbour-joining con il programma MEGA 5.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Esame anatomopatologico

Nei soggetti più giovani (19 giorni), è stato osservato un quadro prevalentemente enterico con enterite catarrale ed esiti di malassorbimento (ossa gombose, difformità di sviluppo) ingestione di alimento misto a lettiera, pellicola dello stomaco muscolare in alcuni tratti di aspetto ipercheratosico e parzialmente erosa. Nei soggetti di 24 giorni sono state osservate lesioni analoghe ma tendenzialmente più gravi con lieve ipertrofia dello stomaco ghiandolare e del fegato. Nei soggetti di 31 giorni sono state osservate gravi lesioni a carico del fegato di aspetto iperplastico, con esiti di stasi e principio di fenomeni degenerativi, proventriglio notevolmente aumentato di volume e spessore, edematoso nella zona sub-follicolare, materiale bianco lattiginoso all'interno dei follicoli ghiandolari fortemente iperplastici ed emorragici. L'intestino presentava una lieve enterite catarrale, meno grave rispetto a quanto osservato negli animali più giovani. Infine nei soggetti di 38 giorni sono state riscontrate lesioni simili a quelle osservate a 31 giorni, leggermente più gravi a livello di proventriglio. In sintesi le lesioni anatomopatologiche evidenziate nei soggetti più giovani erano suggestive di un quadro enterico, mentre per i soggetti di maggior età, l'esame anatomopatologico ha confermato un'attenuazione della forma enterica con lesioni localizzate a livello proventricolare.

### Esami Batteriologici

Non hanno messo in evidenza agenti patogeni

### Indagini Biomolecolari, microscopia elettronica (ME) e Sequenziamento Genomico

I risultati delle indagini condotte sono sintetizzati nella Tabella 1 in cui sono confrontati gli esiti delle diverse prove sui campioni.

In particolare nei soggetti di età compresa tra **19 e 24 giorni** le analisi in PCR e ME hanno mostrato la presenza di Reovirus (PCR) e Rotavirus (ME). Nei soggetti di **31 giorni**, con quadro anatomopatologico suggestivo di proventricolite, le indagini di laboratorio hanno dimostrato la presenza di Adenovirus (FAV) in PCR da intestino e fegato. La presenza di Adenovirus è stata inoltre confermata in ME che ha messo, inoltre, in evidenza la presenza di particelle Enterovirus-like nell'intestino. Nei soggetti di **38 giorni**, con lesioni proventricolari maggiormente evidenti, i campioni di intestino, proventriglio e fegato sono tutti risultati positivi alla PCR per Adenovirus, la cui presenza è stata confermata anche in ME. I campioni di intestino sono inoltre risultati positivi alla PCR Reovirus.

La PCR per Birnavirus è risultata negativa su tutti i campioni analizzati. Non sono state effettuate indagini per micotossine dal mangime, per Bronchite Infettiva, Anemia infettiva e Malattia di Gumboro, in quanto già escluse come causa di malattia in conferimenti precedenti.

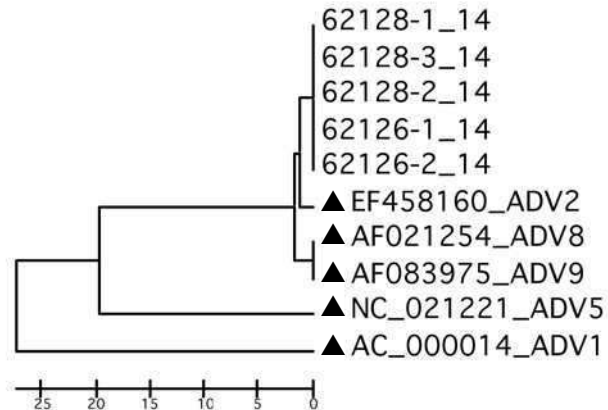
Al fine di confermare l'identificazione dei ceppi virali, i campioni positivi in PCR per Reovirus e Adenovirus, sono stati sottoposti a sequenziamento. Per gli Adenovirus sono stati sequenziati campioni da fegato e proventriglio. (Figura 2), L'analisi delle sequenze ottenute ha dimostrato la completa identità nucleotidica di tutti i campioni che risultano maggiormente correlati ad un ceppo di ADV di sierotipo 2 con cui mostrano il 98.2% di identità nucleotidica (Figura 2).

Il sequenziamento dei campioni di Reovirus ha rivelato un'identità nucleotidica del 93% verso il ceppo di ARV da pollo /Kr/ADL112782 per il campione di intestino dal soggetto a 24 gg e una identità nucleotidica dell'88% verso il ceppo ARV da pollo T178-1 in Blast. Il confronto delle sequenze ottenute e con sequenze di riferimento da GenBank è mostrato in Figura 3. Nell'analisi sono state incluse anche due sequenze di Reovirus ottenute da campioni di intestino prelevati precedentemente da soggetti provenienti dalla stessa azienda con lesioni suggestive di enterite virale, analizzati dal laboratorio tra dicembre e gennaio. Nel dendrogramma si nota l'esistenza di una possibile maggior correlazione tra la sequenze 62128 corrispondente al soggetto di 38 gg di Marzo 2014 e la sequenza del soggetto di pari età (40gg) relativo al conferimento del Dicembre 2013 che, pur mostrando una non elevata identità nucleotidica tra loro (85%) risultano molto più diversi agli altri campioni provenienti da animali di età inferiore.

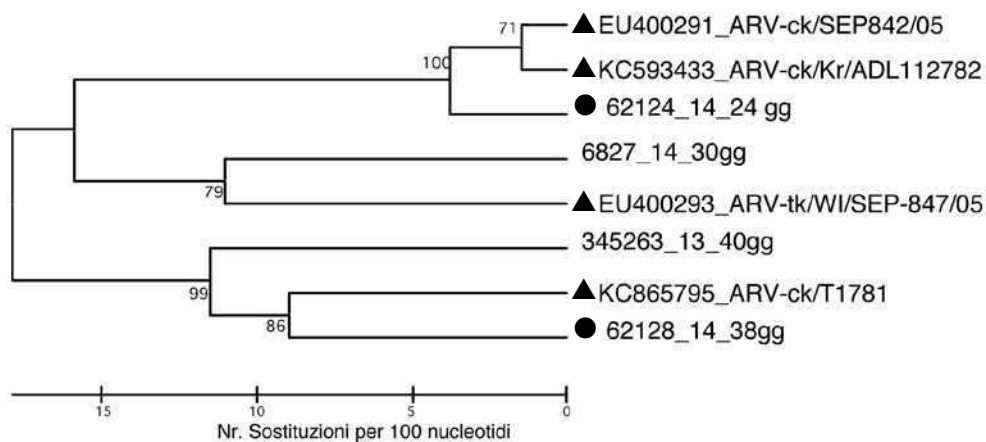
**Tabella1:** indagini Biomolecolari e Microscopia Elettronica (ME) e Sequenziamento Genico

Età degli animali	organi	PCR REOV	PCR ADEV	PCR BIRNAV	ME	SEQUENZIAMENTO Identità nucleotidica in Blast
19 gg	intestino	P	N	N	P Rotavirus	Reovirus (non seq)
	fegato	N	N	/	/	/
	proventriglio	N	N	N	N	/
24 gg	intestino	P	N	N	P Enterovirus like	Reovirus (Dendrogramma) 93% vs ARV-ck/Kr/ADL112782 KC593433
	fegato	N	N	/	N	
	proventriglio	N	N	N	N	
31 gg	intestino	N	P	N	P Enterovirus like	Adenovirus (non seq)
	fegato	N	P	/	/	Adenovirus 92.8% vs ADV2 (EF458160) (Dendrogramma)
	proventriglio	N	N	N	/	/
38 gg	intestino	P	P	N	P Adenovirus	Reovirus /Adenovirus (Dendrogramma-Reo) 88% vs ARV-ck/T178 (KC865795)1
	fegato	N	P	N	/	Adenovirus (non seq)
	proventriglio	N	P	N	N	Adenovirus 92.8% vs ADV2 (EF458160) (Dendrogramma)

**Figura 2:** Dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale della orf20A dei campioni di *Adenovirus* oggetto dello studio che mostrano una identità nucleotidica del 98.2% verso una sequenza di ADV2.▲: sequenze di riferimento sierotipi 1, 2, 5, 8 e 9 disponibili in GenBank



**Figura 3:** Dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del Segmento S4 del genoma dei ceppi di Reovirus. Le sequenze dei campioni oggetto dello studio (●) sono confrontate con due sequenze di reovirus ottenute da campioni di intestino prelevati da soggetti provenienti dalla stessa azienda, con lesioni suggestive di enterite virale, analizzati dal laboratorio tra dicembre e gennaio.e con (▲) lesequenze di riferimento disponibili in GenBank(▲) .



## CONCLUSIONI

Sulla base delle risultanze degli esami antomo-patologici, di PCR e diME è stato possibile confermare il sospetto diagnostico di enterite virale nei soggetti di età compresa tra **19 e 24 giorni**.

Nei soggetti di **31 giorni**, con quadro anatomopatologico suggestivo di proventricolite, le indagini di laboratorio hanno dimostrato la presenza di Adenovirus (FAV) in PCR da intestino e fegato, la ME ha confermato la presenza di Adenovirus con l'ulteriore riscontro della presenza di Enterovirus like da intestino. Nei soggetti di **38 giorni**, con lesioni proventricolari maggiormente evidenti, i campioni di intestino, proventriglio e fegato sono tutti risultati positivi alla PCR Adenovirus, confermati in ME. I campioni di intestino sono inoltre risultati positivi alla PCR Reovirus. I risultati delle analisi effettuate sui soggetti di età maggiore pertanto suggeriscono un'evoluzione della malattia anche in termini di diffusione dell'agente patogeno nei vari organi. Il sequenziamento del campione risultato positivo per ADV indica una correlazione con un ceppo ADV di Sierotipo 2. Purtroppo non sono disponibili dati diagnostici sulle faraone presenti nello stesso ambiente di allevamento, ma sarebbe auspicabile un confronto tra i virus isolati dal pollo e dalle stesse faraone.

Più complessa è l'interpretazione del sequenziamento per Reovirus per cui l'analisi di sequenza ha evidenziato la presenza di quattro sequenze diverse scarsamente correlate tra loro ad eccezione delle due sequenze ottenute dai soggetti della stessa età (38-40gg), ma appartenenti a due cicli produttivi diversi .

Lo studio condotto ha evidenziato una correlazione diretta tra lesioni anatomopatologiche proventricolari e riscontro eziologico da FAV sierotipo 2, la presenza di faraone nello stesso ambiente di allevamento potrebbe aver avuto un ruolo importante nel determinismo della malattia, ma ciò non è stato dimostrato. Nonostante siano frequentemente osservati episodi di malattia riconducibili a proventricolite, l'eziologia (infettiva o non infettiva), rimane un aspetto non ancora del tutto chiarito. Per questo motivo, sarebbe auspicabile implementare ed approfondire studi di prevalenza e indagini di laboratorio su questa sindrome.

## BIBLIOGRAFIA

- Dandár E, Bálint A, Kecskeméti S, Szentpáli-Gavallér K, Kiszfali P, Melegh B, Farkas SL, Bányai K. (2013). Detection and characterization of a divergent avian reovirus strain from a broiler chicken with central nervous system disease. Arch Virol.2013 Dec;158(12):2583-8. doi: 10.1007/s00705-013-1739-y. Epub 2013 Jun 16.
- Guy JS, West AM, Fuller FJ. (2011). Physical and genomic characteristics identify chicken proventricular necrosis virus (R11/3 virus) as a novel Birnavirus. Avian Dis. 55(1): 2-7.
- Koo BS, Lee HR, Jeon EO, Han MS,Min KC, Lee SB,Mo IP. (2013). Molecular survey of enteric viruses in commercial chicken farms in Korea with a history of enteritis. Poult Sci\_ 2013 Nov;92(11):2876-85. doi: 10.3382/ps.2013-03280.
- Jiang P, Ojkic D, Tuboly T, Huber P, Nagy É. (1999). Application of the polymerase chain reaction to detect fowl Adenoviruses. Can. J. Vet. Res. 63:124-128.

- Lenz SD, Hoerr FJ, Ellis AC, Toivio-Kinnucan MA, Yu M. (1998). Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and *Reoviruses* isolated from broiler chickens in Alabama. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 145-151.
- Ottiger HP. (2010). Development, standardization and assessment of PCR systems for purity testing of avian viral vaccines. *Biologicals.* 38: 381-388.
- Pantin-Jackwood MJ, Day JM, Jackwood MW, Spackman E. (2008). Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. *Avian Dis.* 52: 235-244.
- Romanova N, Corredor JC, Nagy É. (2009). Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 159: 58-63.
- Songserm T, van Roozelaar D, Kant A, Pol J, Pijpers A, Ter Huurne A. (2003). Enteropathogenicity of Dutch and German avian *Reoviruses* in SPF white leghorn chickens and broilers. *Vet. Res.* 34: 285-295.
- Van Loon AAWM, Koopman HC, Kosman W, Mumczur J, Szeleszczuk O, Karpinska E, Kosowska G, Lütticken D. (2001). Isolation of a new serotype of avian *Reovirus* associated with malabsorption syndrome in chickens. *Vet. Quart.* 23: 129-133.

## **PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI* E *CAMPYLOBACTER LARI* IN BROILER REGOLARMENTE MACELLATI; PROFILO DI ANTITIBIOTICO RESISTENZA**

Fiorentini L.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, Milandri C.<sup>2</sup>, Usberti R.<sup>2</sup>, Rosetti M.<sup>2</sup>, Ricci G.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna  
Sezione diagnostica di Forlì

<sup>2</sup> Azienda Unità Sanitaria Locale della Romagna, distretto di Forlì,  
area Sanità Pubblica

### **Summary**

Thermophilic *Campylobacter spp.* have been recognized as major cause of foodborne infections in many countries throughout the world. Poultry meat is the most common source for foodborne cases of human campylobacteriosis. In order to study the prevalence of *Campylobacter* in broiler chickens a study was carried out in a slaughterhouse during 2012. The study was performed on 50 flocks. The overall prevalence of the *Campylobacter spp.* infection was 76% of the tested flocks. The prevalence of the *C. jejuni* infection was 36%, *C. coli* 32%, association *C. jejuni* and *C. coli* 6% and *C. lari* infection 2% of the tested flocks. In the second part of the study twenty *Campylobacter* strains (ten strains of *C. jejuni* and ten strains of *C. coli* from skin and ceca), were tested by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for their susceptibility to Penicilin, Betalactams, Macrolides, Tetracyclines, and Fluoroquinolones. All isolated strains of *Campylobacter* were fully susceptible to Penicilin. Low resistance were detect for Amoxicillin ranging from 10% and 20%. Very high resistance rates were detect for Macrolides (ranging from 10% and 60%), Tetracyclines (60%), and Fluoroquinolones (ranging from 40% and 50%). No isolates showed resistance to Tiamulina. *Campylobacter* is a leading foodborne bacterial pathogen, which causes gastroenteritis in humans. This pathogenic organism is increasingly resistant to antibiotics, especially Fluoroquinolones and Macrolides, which are the most frequently used antimicrobials for the treatment of campylobacteriosis when clinical therapy is warranted. For this reason, the study's antibiotic resistance is a major public health problem and current.

### **INTRODUZIONE**

Dal 2005 l'infezione zoonotica segnalata con maggior frequenza nell'uomo è la Campilobatteriosi di cui si è registrato un continuo aumento del numero di casi negli ultimi anni. Con oltre 190.000 episodi di malattia diagnosticati ogni anno nell'uomo, rappresenta la zoonosi alimentare più frequentemente segnalata nell'Unione Europea (UE). La principale fonte d'infezione è il consumo di carne di pollame poco cotta o di prodotti alimentari pronti per l'uso venuti a contatto con carne di pollame cruda. La manipolazione sicura della carne cruda e di altri ingredienti alimentari crudi, una buona cottura ed un'attenta igiene, possono prevenire o ridurre il rischio posto dai cibi contaminati. Al fine di proteggere i consumatori da questa minaccia alla salute pubblica, l'Unione Europea ha adottato un approccio integrato alla sicurezza alimentare che coinvolge l'intera

filiera, dall'allevamento alla tavola. Tale approccio si basa sull'analisi dei dati di prevalenza e antibiotico-resistenza e sulla valutazione dei rischi posti da questo battere. Gli studi condotti dall'UE, hanno riscontrato un'elevata prevalenza di *Campylobacter* nel pollo da carne. In media il battere è stato rinvenuto a livello intestinale nel 71% dei casi (dato Europeo) e nel 72,3% dei casi (dato Italiano). Sul totale dei ceppi batterici isolati, il 60% era rappresentato da *C. jejuni*; il 45% da *C. coli* e lo 0,2% da *C. lari*. (Di Giannatale E. *et al*, 2010; Ricci A. *et al*, 2006). In Emilia Romagna, nel 2008, sono stati analizzati 100 lotti di macellazione: la ricerca di *Campylobacter spp.* termofili in campioni ciecali, ha evidenziato positività nel 52% dei lotti testati. (Rugna *et al*, 2009) Le conoscenze sulle vie di contaminazione del pollame in allevamento non sono ancora del tutto definite, ma il livello di biosicurezza, la stagionalità, l'età degli animali, l'alimento e le terapie somministrate sono tutti fattori fortemente correlati alla diffusione del *Campylobacter* negli allevamenti avicoli. La contaminazione delle carni avviene durante le fasi di macellazione, attraverso il contatto con materiale fecale. Per questo motivo, la fase di eviscerazione risulta un punto critico, questo perché negli avicoli e, specialmente nel broiler, la colonizzazione del *Campylobacter* avviene in maniera imponente e asintomatica a livello ciecale. Quest'ultima evidenza risulta essere di particolare rilevanza in quanto dimostra come il *Campylobacter* possa così facilmente raggiungere il consumatore attraverso il consumo di alimenti contaminati. Lo studio condotto si è posto quindi l'obiettivo di valutare la prevalenza del *Campylobacter* in un importante macello avicolo di portata industriale e di aumentare le conoscenze relative all'antibiotico-resistenza del battere isolato nel corso della stessa sperimentazione. L'antibiotico-resistenza è un problema di Sanità Pubblica estremamente attuale e l'approfondimento delle conoscenze in tale settore è considerato strategico per la salute e la tutela dei consumatori.

## MATERIALI E METODI

### Campionamento

I prelievi sono stati eseguiti in un macello avicolo industriale dell'Emilia Romagna dove annualmente vengono macellati 31.000.000 polli in filiera integrata. Si tratta di un macello completamente automatizzato, con un sistema di stordimento degli animali di tipo elettrico (elettronarcosi) e con eviscerazione meccanica. Le carcasse eviscerate vengono in parte commercializzate tal quali, la restante parte, viene sezionata e sottoposta a lavorazioni con produzione di carni fresche, preparazioni carnee e prodotti a base di carne. Tutte le fasi della macellazione, fino alla produzione dei busti eviscerati e del sezionamento sono automatizzate.

Lo studio è stato condotto tra maggio e dicembre 2012. Sono stati analizzati 50 diversi lotti di macellazione (lotto = partita di polli da carne allevati nello stesso gruppo e condotti al macello lo stesso giorno), 9 lotti provenienti da aziende con un numero di capi compresi tra 10000 e 49000, 11 lotti da aziende con un numero di capi compresi tra 50000 e 99000, la maggior parte dei lotti, 30, da aziende con un numero di capi > di 100000. Gli allevamenti oggetto dello studio erano 39 distribuiti in 9 province italiane.

Da ogni lotto sono stati scelti 10 soggetti a random, da ciascun soggetto, nella fase di eviscerazione, è stato prelevato un campione di cute alla base del collo di circa 25 gr, tonsille ciecali e ciechi integri, fegato con cistifellea sempre integra. Tutti i

campioni sono stati singolarmente introdotti in contenitori sterili ed identificati per soggetto quindi refrigerati. Le analisi di laboratorio sono state condotte lo stesso giorno del prelievo al macello.

### Prove microbiologiche

La procedura di isolamento del *Campylobacter* è stata effettuata con una metodica in accordo alla ISO 10272-1:2006, tale prova è stata applicata anche alla matrice "ciechi" non contemplati nel campo di applicazione del metodo, previa diluizione e filtrazione degli stessi campioni. Per i campioni di ciechi, a livello di tonsille ciecali, sono state condotte indagini microbiologiche in parallelo mediante semina diretta su terreno solido selettivo Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCD) e Columbia Blood Agar (CBA). Tutti i ceppi di *Campylobacter* isolati sono stati sottoposti ad identificazione di specie mediante l'impiego di Kit biochimici miniaturizzati, quindi liofilizzati, allo scopo di essere sottoposti contemporaneamente alle prove di antibiotico resistenza.

### Prove biomolecolari

Tutti i campioni, a partire dal terreno di arricchimento Bolton Broth, dopo 24 ore di incubazione a 41,5°C in condizione di microaerofilia, sono stati sottoposti a PCR Real – Time iQ-Chek™ *Campylobacter* Kit (Bio-Rad), metodo interno per la ricerca di *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* da matrici alimentari. Per i campioni positivi in PCR Real-Time, è stata effettuata una seconda reazione di PCR RealTime multiplex finalizzata all'identificazione di *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* mediante l'utilizzo di sonde Taqman (Mayr *et al.*, 2010; Best *et al.*, 2003). Le sequenze dei primer e delle sonde utilizzate sono riportate in tabella. Solo nel caso di *C. lari* sono state utilizzate due coppie di primer ed una sonda, sono invece inclusi una coppia di primer ed una sonda per l'identificazione di *C. jejuni* ed una coppia di primer ed una sonda per l'identificazione di *C. coli*. Le mix di reazione sono allestite in 25µl totali contenenti: 300nM di ogni primer, 100nM di ogni sonda, 12,5µl di Taqman Universal PCR Master mix (Applied Biosystems) e 5 µl di DNA estratto. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C per 10 min), 45 X (95°C per 30 sec; 60°C per 45 sec, 72°C per 30 sec).

Target	Oligonucleotide	Sequenza	Referenza
<i>C. jejuni</i>	mapA-fw	CTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATT	Mayr et al., 2010
	mapA-rev	AATACCAGTGTCTAAAGTGCCTTTAT	
	mapA-probe	HEX-TTGAATCCAACATCGCTAATGTATAAAAGCCCTTT	
<i>C. coli</i>	ceuE-fw	AAGCTCTTATTGTTCTAACCAATTCTAACA	Best et al., 2003
	ceuE-rev	TCATCCACAGCATTGATTCCTAA	
	ceuE-probe	Cy5-TTGGACCTCAATCTCGCTTTGGAATCATT	
<i>C. lari</i>	GyrA1-fw1	GATAAAGATACGTTTGATTTGTACC	Best et al., 2003
	GyrA1-fw2	GAAAAAGATACAGTTGATTTTATACC	
	GyrA1-re1	CAGCTATACCACTTGATCCATTAAG	
	GyrA1-re2	TGCAATACCACTTGAACCATTA	
	GyrA1-probe	FAM-TTATGATGATTCTATGAGTGAGCCTGATG	

### Valutazione della sensibilità agli antibiotici

Sono state condotte prove *in vitro* di sensibilità agli antibiotici per i ceppi isolati attraverso la tecnica della Minima Concentrazione Inibente (MIC) (Andrews J.M., 2001). Sono state impiegate piastre microtiter a 96 pozzetti contenenti 1 µg di diversi antibiotici disidratati impiegati in campo umano e veterinario, in tutto 9 molecole tra Betalattamici, Fluorochinoloni, Tetracicline, Macrolidi ed una Pleuromutilina

E' stato allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame di *Campylobacter*. a partire da un'emulsione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario 0.5. Fasi seguenti:

- Inoculazione di 100 µl di sospensione standardizzata in 11 ml di Bolton Broth.
- Inoculazione di tutti i pozzetti con 100 µl di sospensione batterica per pozzetto.
- Incubazione per 18-24 ore a 41,5°C in microaerofilia.
- Lettura dei risultati: la MIC è stata calcolata in base all'ultimo pozzetto che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico le MIC sono state definite come maggiori-uguali (≥) rispetto alla concentrazione più alta. Quando non si verificava crescita batterica in tutte le concentrazioni, le MIC sono state registrate come minori o uguali (≤) rispetto alla concentrazione più bassa.

### RISULTATI E DISCUSSIONE

#### Prove microbiologiche e studio di prevalenza

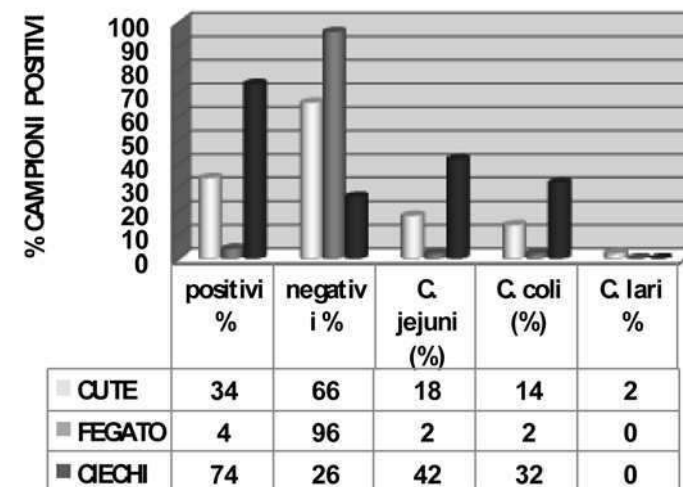
Sono stati sottoposti ad indagine microbiologica finalizzata all'isolamento ed identificazione del *Campylobacter* un totale di 1500 campioni:

50 lotti di macellazione

10 animali per lotto

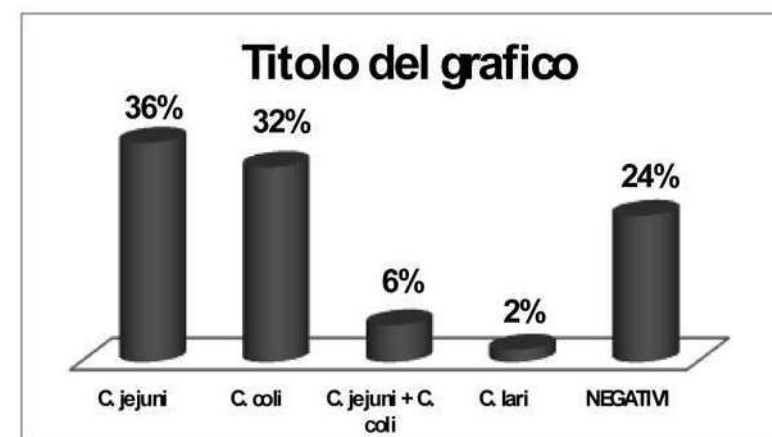
10 campioni di cute, 10 campioni di fegato; 10 campioni di ciechi integri (identificati per soggetto). Su 500 campioni di cute (circa 25 gr prelevati alla base del collo prima dell'eviscerazione), il 34 % è risultato positivo all'isolamento per *Campylobacter*, di cui il 18% per *C. jejuni*, il 14 % per *C. coli* ed il 2% per *C. lari*. Su 500 campioni di fegato, solo il 4% è risultato positivo all'isolamento per *Campylobacter*, di cui il 2% per *C. jejuni* ed il 2% per *C. coli*. Su 500 campioni di ciechi il 74% è risultato positivo per *Campylobacter* di cui il 42% per *C. jejuni* ed il 32% per *C. coli*. Le indagini microbiologiche con semina diretta su terreni mCCD e CBA allestite a partire dalla matrice ciechi (alla base delle tonsille ciecali), hanno dato migliori risultati con un maggior numero di isolati, se confrontati con l'applicazione della ISO 10272-1:2006. Come auspicabile, i dati ottenuti dimostrano un'alta prevalenza di *Campylobacter* a livello ciecale con prevalenza maggiore registrata per *C. jejuni*, quest'ultimo dato risulta essere in leggera controtendenza con gli studi di prevalenza fatti in Italia e nel resto dell'UE nei quali si segnala una prevalenza maggiore per *C. coli*. (Figura 1)

**Figura 1:** percentuale dei campioni positivi per *C. jejuni*, *C. coli* e *C lari* nelle diverse matrici sottoposte ad indagine microbiologica



I dati analizzati fino ad ora si riferiscono alle singole matrici oggetto dello studio, se si considerano infine i risultati microbiologici ottenuti per lotto di macellazione, il 36% dei lotti è risultato positivo per *C. jejuni*, il 32% per *C. coli*, il 6% per l'associazione *C. jejuni* e *C. coli* ed il 2% per *C. lari*, pari ad una percentuale totale di positività dei lotti analizzati pari del 76%. Quest'ultimo dato è in linea con i valori medi ottenuti negli studi di prevalenza Europei, ma leggermente più alto rispetto allo studio di prevalenza condotto in Italia nel 2008. (Figura 2)

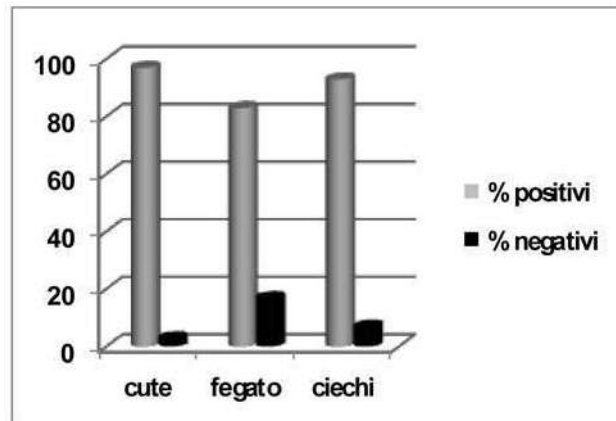
**Figura 2:** percentuale dei campioni positivi per *C. jejuni*, *C. coli* e *C lari* nei diversi lotti di macellazione



### Prove biomolecolari

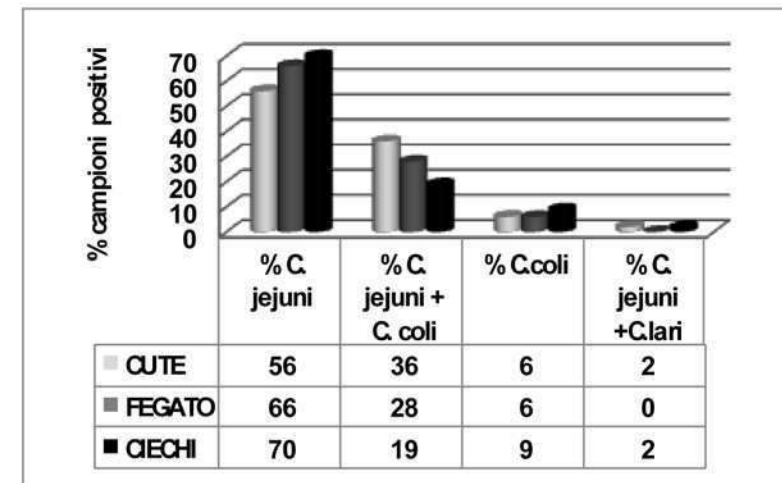
Tutti i campioni, in totale 1500, arricchiti in Bolton broth sono stati sottoposti a PCR Real – Time iQ-ChekK™ *Campylobacter* Kit (Bio-Rad), metodo interno per la ricerca di *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* da matrici alimentari: la cute è risultata positiva per *Campylobacter* termotollerante nel 97% dei casi, il fegato nell'83% ed i ciechi nel 93% dei campioni. Questi dati dimostrano come il genoma batterico sia ampiamente diffuso nelle matrici analizzate; trattandosi di prelievi effettuati in fase di eviscerazione è ipotizzabile una cross contamination, per questo motivo tale dato non può essere considerato nello studio di prevalenza, ma sicuramente non può essere trascurato nella valutazione dei fattori di rischio che intervengono durante il processo di trasformazione delle carcasse al macello fino al prodotto finito. (Figura 3)

**Figura 3:** percentuale dei campioni positivi alla PCR Real-time iQ-ChekK™ *Campylobacter* Kit (Bio-Rad)



Tutti i campioni positivi alla PCR Real-Time, sono stati sottoposti ad una seconda reazione di PCR Real Time multiplex finalizzata all'identificazione di *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Per i campioni di cute il 56 % è risultato positivo per *C. jejuni*, il 36% per *C. jejuni* associato a *C. coli*, il 6% per *C. coli* ed il 2% per l'associazione *C. jejuni* e *C. lari*. Per i campioni di fegato la maggior percentuale, il 66%, è risultata positiva per *C. jejuni*, il 28% per l'associazione *C. jejuni* e *C. coli* ed il 6% per *C. coli*. I campioni ciecali sono risultati positivi per il 70% per *C. jejuni*, il 19% per *C. jejuni* associato a *C. coli*, il 9% per *C. coli* ed il 2% per l'associazione *C. jejuni* e *C. lari*. I dati ottenuti confermano un'elevata prevalenza di *C. jejuni* su tutti i campioni analizzati. (Figura 4)

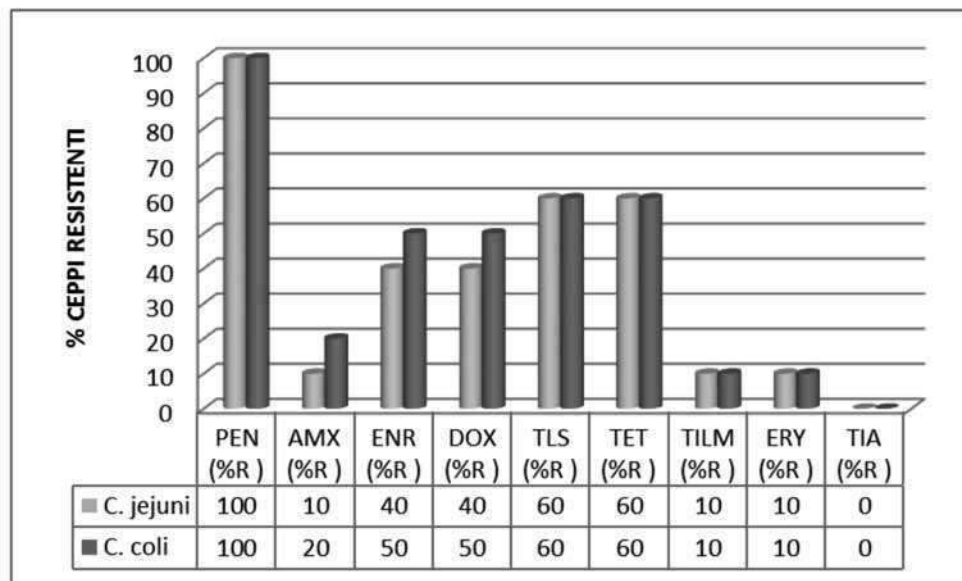
**Figura 4:** percentuale dei campioni positivi alla PCR Real-time Multiplex



### Sensibilità agli antibiotici

Per lo studio di sensibilità agli antibiotici sono stati selezionati ceppi di *Campylobacter* isolati da 20 diversi lotti di macellazione: 10 ceppi di *C. jejuni* e 10 ceppi di *C. coli* (isolati da cute ed intestino cieco). I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato fenomeni di resistenza nei confronti dei 9 antibiotici testati. Rilevante la resistenza agli antibiotici beta-lattamici con resistenza del 100% dei ceppi alla Penicillina e con valori compresi tra 10% e 20% per Amoxicillina; per quanto riguarda la classe dei Fluorochinoloni (Enrofloxacin) la resistenza oscilla tra il 40% e 50%. Per quanto concerne la resistenza alle Tetracicline, i valori sono compresi tra il 40% ed il 60%; la classe dei Macrolidi (Eritromicina, Tilmicosina e Tilosina) ha dato risultati controversi con range di resistenza molto ampi compresi tra il 10% per Eritromicina, Tilmicosina e 60% per Tilosina, quest'ultima molecola, più delle altre, ampiamente impiegata in medicina veterinaria. Nessuna resistenza è stata registrata per la classe delle Pleuromutiline (Tiamulina). Non è stata osservata grande differenza di antibioticoresistenza tra *C. jejuni* e *C. coli*, ma entrambi si sono dimostrati più inclini a sviluppare resistenza verso Fluorochinoloni, Macrolidi e Tetracicline. I ceppi che hanno manifestato maggiore resistenza agli antibiotici sono quelli isolati da novembre a dicembre, non è da escludere che tale fenomeno trovi giustificazione nella maggiore pressione terapeutica in allevamento che gli animali subiscono nel periodo indicato. (Figura 5)

**Figura 5:** Minima Concentrazione inibente: percentuale di ceppi di *Campylobacter* resistenti



## CONCLUSIONI

Lo studio condotto si è posto l'obiettivo di valutare la prevalenza del *Campylobacter* nei broiler regolarmente macellati, di individuare e di aumentare le conoscenze relative all'antibiotico-resistenza del battere isolato nel corso della stessa sperimentazione. Quest'ultimo aspetto nasce dall'esigenza di monitorare uno dei maggiori problemi emergenti di Sanità Pubblica rappresentato dal crescente rischio di resistenza agli antibiotici riscontrato sia in medicina che in agricoltura. Nel settore della medicina veterinaria, l'utilizzo di mangimi medicati, l'adozione di misure chemioterapiche profilattiche di massa, hanno portato ad una progressiva selezione di microrganismi antibiotico-resistenti (EFSA 2012). Diversi studi dimostrano tale resistenza in *Campylobacter* isolati da broiler. I dati EFSA 2011 e 2012 (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), riportano percentuali molto elevate di ceppi batterici resistenti alla Ciprofloxacina (Media UE: 47%) (Nachamkim I. *et al*, 2001), un antimicrobico Fluorochinolone, d'importanza fondamentale in medicina umana. Non è da escludere quindi come l'uso dei Fluorochinoloni usati come chemioterapici e per la profilassi in allevamento sia direttamente implicato nello sviluppo della resistenza a questa classe di farmaci antimicrobici da parte del *Campylobacter*. Un'altra classe di farmaci largamente diffusi in medicina veterinaria è rappresentata dai Macrolidi quali Tilosina, Eritromicina e Tilmicosina. I dati EFSA 2011 e 2012 riferiscono percentuali di resistenza comprese tra l'1% (Olanda) e 11% (Belgio) a dimostrazione del fatto che i *Campylobacter* Macrolidi-resistenti sono generalmente più rari rispetto ai ceppi resistenti ai Fluorochinoloni (Ladely SR *et al*, 2007). Un'altra classe

di farmaci presa in considerazione in funzione dell'ampio spettro e del diffuso impiego, è rappresentata dalle Tetracicline (Ossitetraciclina, Doxiciclina). Sempre i Report EFSA 2011 e 2012 riferiscono per l'UE, percentuali medie di resistenza dal 40% per *C. jejuni* e 46% per *C. coli*. I risultati ottenuti in questa sperimentazione hanno dimostrato una percentuale di resistenza più alta per Tilosina, pari al 60%, rispetto ai dati forniti dai recenti report EFSA. Per gli altri macrolidi (Tilmicosina, Eritromicina), per la classe dei Fluorochinoloni e delle Tetracicline, i risultati ottenuti nella sperimentazioni sono sovrapponibili a quelli Europei. I ceppi di *Campylobacter* resistenti o multiresistenti possono facilmente raggiungere l'uomo provocando in alcuni casi malattia con la possibilità di compromettere l'efficacia delle terapie antibiotiche mirate al trattamento dell'infezione da parte di questo battere. Lo studio, condotto da diverse matrici (cute, fegato e ciechi) prelevate da 500 carcasse scelte casualmente e provenienti da 50 partite (distribuite su 9 province del territorio nazionale), ha riscontrato un'elevata prevalenza di *Campylobacter* nel pollo da carne. In media il battere è stato rinvenuto nei diversi lotti analizzati nel 76% dei casi con maggiore presenza di *C. jejuni* (36%) seguito da *C. coli* (32%) e *C. lari* (2%). I massimi livelli di contaminazione sono stati riscontrati a livello ciecale (ad indicare un'infezione in allevamento pre-macellazione) e maggiormente rappresentati da *C. jejuni*. I dati ottenuti sono in linea con i dati Europei e descritti dalla bibliografia (Horrock SM *et al*, 2009). Non è stata osservata grande differenza di antibiotico resistenza tra *C. jejuni* e *C. coli*, ma entrambi si sono dimostrati più inclini a sviluppare resistenza verso Fluorochinoloni, Macrolidi e Tetracicline. I fattori di rischio che intervengono nell'infezione da *Campylobacter* nel broiler e l'individuazione delle nicchie ecologiche che il microrganismo utilizza per la sua sopravvivenza non sono del tutto noti. La riduzione della prevalenza di contaminazione nella carne di pollo può essere ottenuta intervenendo nella fase di produzione primaria e tramite misure sanitarie mirate alla riduzione delle cross-contaminazioni in fase di macellazione e trasformazione. La diminuzione del rischio di Campylobatteriosi umana si concretizza quindi con l'adozione di corrette pratiche di gestione, igiene e biosicurezza per evitare la contaminazione dei prodotti a base di carne cruda negli impianti di trasformazione, ma anche attraverso corrette pratiche igieniche a livello di manipolazione, preparazione e cottura dei cibi. In merito al problema dell'antibiotico-resistenza, partendo dal presupposto che *Campylobacter* resistenti selezionati negli allevamenti, possono facilmente raggiungere l'uomo attraverso l'alimento (Mylius SD *et al*, 2007), appare chiara la necessità di monitorare e approfondire le ricerche su tale fenomeno al fine di sensibilizzare i produttori ad un utilizzo sempre più razionale del farmaco veterinario.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andrews JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5-16
2. Best EL, Powell EJ, Swift C, Grant KA, Frost JA. (2012). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. 229(2): 237-241.

3. Consiglio dell'Unione Europea (CE) 2003. Regolamento (CE) N. 2160/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti. *Off. J. L325*, 12/12/2003, 1-15.
4. Di Giannatale E, Prencipe V, Colangeli P, Alessiani A, Barco L, Staffolani M, Tagliabue S, Grattarola C, Cerrone A, Costa A, Pisanu M, Santucci U, Iannitto G, Migliorati G. (2010). Prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nel pollo da ingrasso in Italia. *Vet. Ital.* 46(4): 405-414.
5. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(5):3196
6. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(3):3590.
7. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(2):3547.
8. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(4):3129.
9. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Food Microbiol.* 15:18-25.
10. ISO 10272-1:2006: Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* Part I: detection method
11. Ladely SR, Harrison MA, Fedorka-Cray PJ, Berrang ME, Englen MD, Meinersmann RJ. (2007). Development of macrolide-resistant *Campylobacter* in broiler administered subtherapeutic or therapeutic concentration of tylosin. *J. Food Protect.* 70: 1945-1951.
12. Mayr AM, Lick S, Bauer J, Thärigen D, Busch U, Huber I. (2010). Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.* 73(2):241-250.
13. Mylius SD, Nauta MJ, Havelaar AH. (2007). Cross-contamination during food preparation: a mechanistic model applied to chicken-borne *Campylobacter*. *Risk Analysis.* 27(4): 803-813.
14. Nachamkin I, Ung H, Li M. (2002). Increased fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1501-1503.
15. Ricci A, Amato S, Barco L. (2006). Prevalence of *Campylobacter spp.* in broiler chicken farms of Veneto Region. *Rivista di Avicoltura*, 75(6): 15.
16. Rugna G, Meriardi G, Bardasi L, Bassi S, Dell'Anna S, Fontana MC, Galletti G, Massi P, Santi A, Tamba M. (2009). Indagine sulla diffusione di *Campylobacter spp.* nei broiler macellati in Emilia- Romagna. Atti del XIX Convegno Nazionale AIVI, Perugia 24-25-26 giugno, 2009

## IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENOMICO DEI CEPPI DI VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO (IBDV) ISOLATI NEL POLLO DA CARNE IN ITALIA E IN PAESI ESTERI NEGLI ANNI 2012, 2013 E 2014

Massi P.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Barbieri I.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Sezione di Forlì, via Marchini n.1 -forli@izsler.it

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Brescia-

### Summary

Viral population dynamics of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) and four non-very virulent IBDV isolated in Italy since 2012 have been analysed and compared to IBDV reference strains. The strains were collected by the intensive farm of five Regions (North, Center and Sud of Italy). The viral population structure of vvIBDV strains showed a strong relationship between geography and phylogeny, with one main group of vvIBDV observed. The low variability and the geographical pattern observed indicate that the virus evolves slowly, occupying the same geographical niche for a long time as for example in Romagna Region. Probably it is depend to the biological features of the virus: being able to remain viable for long periods of time due to a strong environmental resistance, and as an immunosuppressive agent, capable to elude temporally the immune system of the host. About the four nonvvIBDV in commercial broiler, tree of witch in Romagna, is need, for the future, to evaluate their circulation, pathogenicity and the protection offered against them by commercial IBDV vaccines.

In the second part of this study 52 IBDV strains were genetically characterized and compared with reference IBDV strains. Results of the genetic characteristics revealed that the majority of virus (82%) were related to vvIBDV strains. Diagnostic assays that can reliably identify vvIBDV and nonvvIBDV strains are needed for surveillance programs designed to monitor the spread of these viruses.

### INTRODUZIONE

La Malattia di Gumboro (IBD) è sostenuta da un virus che appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. E' stata segnalata circa 50 anni fa ed attualmente è considerata essere endemica nella maggior parte dei paesi a produzione avicola e rappresenta una delle maggior cause di perdita economica per l'industria avicola (Van Der Berg et al., 2000). Il virus IBD causa una malattia acuta ed altamente contagiosa per gli animali giovani (Muller et al., 1979). E' un virus privo di *envelope*, a simmetria icosaedrica, con diametro compreso tra 55 e 65 nm. Si conoscono due sierotipi di IBDV: il sierotipo 1, che comprende ceppi classici, varianti e very virulent (vvIBDV) e il sierotipo 2, che raggruppa ceppi apatogeni.

Indipendentemente dal grado di patogenicità del ceppo coinvolto, l'infezione da IBDV si accompagna sempre ad un danno a carico della borsa di Fabrizio, e quindi, ad immunodepressione specialmente negli animali nelle prime tre, quattro settimane di vita. Il genoma virale è costituito da due segmenti di RNA a doppio filamento,



rispettivamente di circa 3.300 pb (segmento A) e 2.900 pb (segmento B). Il segmento A codifica per tre proteine strutturali (VP2, VP3 e VP4) e per una proteina non strutturale (VP5) che si ritiene importante nella patogenesi. Il segmento B codifica per l'RNA polimerasi (VP1) (Van den Berg, 2000) e che codifica le funzioni essenziali per la replicazione e trascrizione (Von Einem et al., 2004). Tra le proteine strutturali la VP2 è stata quella maggiormente studiata in quanto rappresenta il principale antigene immunodominante dell'IBDV (Vakharia et al., 1994). La regione della VP2 compresa tra gli aminoacidi (aa) 206 e 350 del segmento A, definita "ipervariabile" comprende due picchi idrofilici maggiori che rappresentano gli epitopi neutralizzanti e due picchi idrofilici minori che influenzano la virulenza (Coulibaly et al., 2005). Mutazioni di singoli aminoacidi della regione ipervariabile possono determinare l'elusione della risposta anticorpale indotta dalla vaccinazione, come accade per le varianti, o modificare il tropismo cellulare (Jackwood e Sommer-Wagner, 2011). Nel 1987 furono isolati ed identificati in Europa i ceppi very virulent (vvIBDV) che molto velocemente si sono diffusi in Africa, Asia e Sud America (Lukert e Saif, 1997). In Italia negli inizi degli anni '90 sono stati identificati i primi ceppi very virulent (vvIBDV) in aree geografiche ben definite come la Romagna che rappresentava l'area maggiormente colpita. Quindi negli anni si è assistito ad un diffondersi progressivo della patologia da virus vv anche in altre Regioni ad alta vocazione avicola per poi assistere alla circolazione di ceppi virali classici. Inoltre è stata evidenziata la presenza di ceppi correlati a virus vaccinali ed in parte a ceppi classici (Moreno et al., 2007, Moreno et al., 2010).

Nel 2013 Bonci et al. segnalavano la caratterizzazione molecolare di tre ceppi di campo non vvIBDV che presentavano marcate differenze nella sequenza aminoacidica sia nei confronti dei ceppi circolanti in Italia sia nei confronti di sequenze del gene della VP2 di ceppi di IBDV presenti in GenBank.

Obiettivo del seguente studio è stato quello di raccogliere i risultati dell'attività di sequenziamento della regione ipervariabile della proteina VP2 eseguita su 92 ceppi di IBDV isolati in cinque regioni italiane e su 52 ceppi di IBDV isolati da campioni provenienti da 15 Paesi Esteri dal 2012 ad oggi. L'elaborazione dei risultati della caratterizzazione genomica dei ceppi di IBDV identificati è risultata utile ai fini di una valutazione della circolazione dei genotipi circolanti attualmente sul territorio nazionale e della circolazione dei principali genotipi circolanti in Paesi Esteri che possono avere scambi commerciali con l'Italia.

## MATERIALI E METODI

### -Isolati.

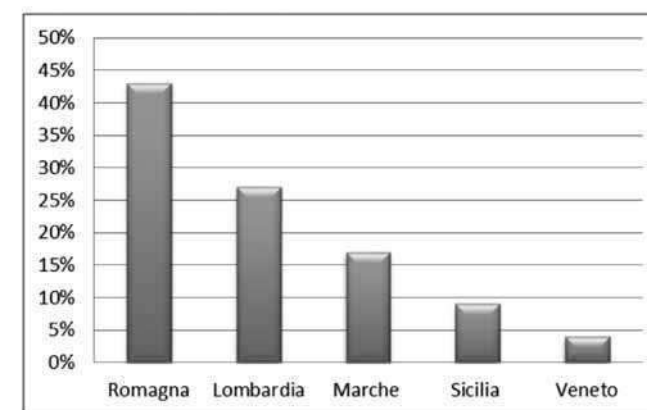
I virus IBDV sono stati isolati nell'ambito dell'attività di diagnostica e di monitoraggio eseguita presso la Sezione Diagnostica di Forlì-IZSLER. Lo studio è stato condotto a partire da organi animali, borse di Fabrizio e su materiale patologico impresso su FTACards® (Woolfe A. et al. (2005) (Seahorn H. et al., 2011) di animali provenienti da allevamenti con sintomatologia clinica e/o lesioni riferibili a Malattia di Gumboro.

### -Ceppi di IBDV isolati da 5 Regioni Italiane.

I virus IBDV erano isolati a partire da: carcasse animali (23 campioni); borsa di Fabrizio (38 campioni) e FTACards (31 campioni). Le forme cliniche osservate erano, in generale, non molto gravi con edema o atrofia della borsa di Fabrizio e lieve aumento della mortalità. Solo in pochi casi è stata rilevata una mortalità superiore a 4-5%. I

materiali patologici provenivano da allevamenti di broiler di cinque Regioni Italiane dal 2012 ad oggi. Nella stragrande maggioranza degli allevamenti veniva applicata la vaccinazione: o in incubatoio con vaccini biotecnologici o in allevamento con vaccini tradizionali mild o intermediate plus. I campioni analizzati provenivano da cinque Regioni italiane come illustrato in figura n.1

**Figura 1:** 92 distribuzione percentuale degli isolati di IBDV provenienti da 5 diverse regioni italiane

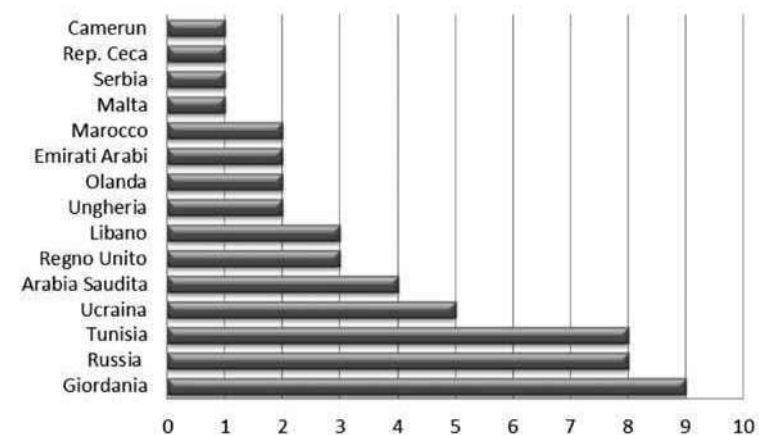


### -Ceppi di IBDV isolati da campioni provenienti da 15 Paesi Esteri.

Il campione era costituito dalla borsa di Fabrizio (6 campioni) o da FTACards (46 campioni). Non si avevano informazioni anamnestiche sugli animali e allevamenti in quanto per questi campioni è richiesto solo un servizio diagnostico di isolamento e sequenziamento dei ceppi virali.

I campioni analizzati provenivano dai seguenti Paesi come da figura n.2

**Figura 2:** 52 isolati di IBDV, provenienza da 15 Paesi esteri



## Rt-PCR

I campioni sono stati testati per rilevare la presenza del genoma virale tramite la metodica rt-PCR descritta da Etteradossi et al., (1997b). Detta metodica utilizza primers specifici che amplificano un frammento di 516bp del segmento A del genoma codificante la regione ipervariabile (HVR) della proteina VP2.

## Sequenziamento ed analisi filogenetica

I prodotti PCR ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers dell'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500xl ( Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASStar). Il confronto delle sequenze con il pannello di ceppi di riferimento utilizzati in routine e di ceppi disponibili in GenBank è stato effettuato mediante allineamento multiplo con il programma MEGA 5.

I ceppi sono stati confrontati con le sequenze del pannello di virus utilizzati come riferimento nell'analisi di routine ( F52/70, DV86, Bursine 2, D78, 228E, Gumbovax Transmune, AviproIBDxtreme, Bur.706, Vaxxitech) e con ceppi disponibili in GeneBank (●).

## RISULTATI

I risultati dell'attività di sequenziamento dei 92 ceppi italiani sono riportati nella tabella n.1.

I ceppi IBVDV (25) provenienti dalla Lombardia, tranne in due casi di sequenza mista, hanno presentato un'omologia che va dal 98 al 100% nei confronti unicamente di ceppi vaccinali: 9 ceppi hanno presentato la maggior omologia nei confronti del ceppo vaccinale Transmune; 13 verso il ceppo vaccinale D78; 1 ceppo verso il ceppo vaccinale 228E. Per i 39 ceppi isolati in Romagna la situazione risulta molto più variegata: 12 ceppi hanno presentato una maggior omologia nei confronti del ceppo vvDV86; 8 ceppi verso il ceppo vaccinale Transmune; ; 3 ceppi verso il ceppo vaccinale 22E; 2 ceppi verso il ceppo vaccinale Bursine2; 2 ceppi verso il ceppo vaccinale D78 e per ultimo 3 ceppi verso il ceppo "non virulent"IT03. Per 8 ceppi provenienti dalla Sicilia si evidenziano 4 ceppi che hanno presentato la maggior omologia verso il ceppo vvDV86; 1 verso il ceppo vv3529/92; 2 verso il ceppo vaccinale D78 ed 1 con sequenza mista. Fra i 16 ceppi provenienti dalle Marche, 6 virus presentano la maggior omologia verso il ceppo vvDV86; 1 ceppo verso il ceppo vvKs; 2 ceppi verso il ceppo vaccinale 22E; 4 verso il ceppo vaccinale D78; 1 verso il ceppo vaccinale Transmune ed 1 verso il ceppo vaccinale Vaxxitek e 1 con sequenza mista. Per i ceppi dal Veneto si registrano 1 ceppo che ha presentato la maggior omologia verso il ceppo vvDV86; 1 ceppo verso il ceppo vvMG8; 1 ceppo verso il vaccino Transmune ed 1 ceppo verso il ceppo di campo "non virulent" IT03.

**Tabella 1:** risultati del sequenziamento di 92 ceppi di IBVDV campionati in Italia

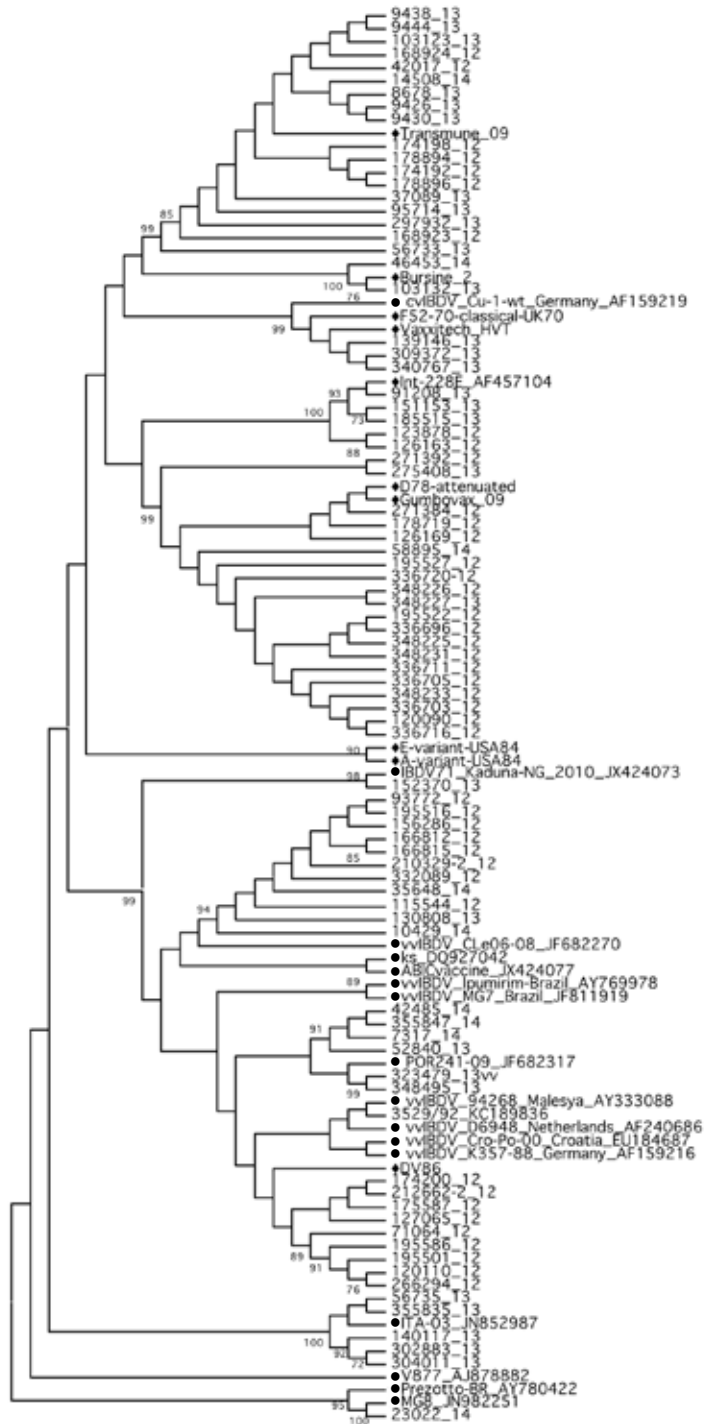
Nr	Regione Italiana	N.Darwin/IZSLER	campione	Risultati sequenziamento
1	Lombardia	42017/2012	Borsa di Fabrizio	100% Transmune
2		115508/2012	borsa	Sequenza mista
3		126163/2012	borsa	99,2% 228E
4		126169/2012	borsa	99,6% D78
5		168923/2012	borsa	99,8% Transmune
6		168924/2012	borsa	100% Transmune
7		336696/2012	FTAcad	99% D78
8		336703/2012	card	99% D78
9		336705/2012	card	98,8% D78
10		336711/2012	card	Sequenza mista
11		336716/2012	card	98,8% D78
12		336720/2012	card	98,8% D78
13		348225/2012	borsa	98,6% D78
14		348226/2012	borsa	98,8% D78
15		348227/2012	borsa	98,8% D78
16		348231/2012	borsa	99% D78
17		348233/2012	borsa	99% D78
18		348235/2012	borsa	99% D78
19		8678/2013	carcassa	100% Transmune
20		9426/2013	borsa	100% Transmune
21		9430/2013	borsa	100% Transmune
22		9438/2013	card	99,8% Transmune
23		9444/2013	card	99,8% Transmune
24		37089/2013	carcassa	100% Transmune
25		275408/2013	borsa	99,6% D78
26	Romagna	47894/2012	Carcassa	Non determinata
27		85841/2012	Carcassa	Sequenza mista
28		123878/2012	carcassa	99,2% 228E
29		127065/2012	carcassa	98,5% DV86
30		156286/2012	borsa	96,3% DV86
31		166812/2012	borsa	96,1% DV86

Nr	Regione Italiana	N.Darwin/IZSLER	campione	Risultati sequenziamento
32		166815/2012	borsa	95,8% DV86
33		174192/2012	card	99% Transmune
34		174198/2012	card	99,8% Transmune
35		174200/2012	card	99,4% DV86
36		175587/2012	carcassa	99,6% DV86
37		178719/2012	carcassa	99,6% D78
38		178894/2012	card	99,8% Transmune
39		178896/2012	card	99,6% Transmune
40		183965/2012	carcassa	Sequenza mista
41		183968/2912	carcassa	Sequenza mista
42		210329/2012	carcassa	96,7% DV86
43		266294/2012	card	97,2% DV86
44		332089/2012	carcassa	96,2% DV86
45		56733/2013	card	99% Transmune
46		56735/2013	card	99% IT03
47		91208/2013	carcassa	99,4% 228E
48		103123/2013	carcassa	99,8% Transmune
49		103132/2013	carcassa	100%Bursine 2
50		140117/2013	card	99% IT03
51		152370/2013	card	97,2% DV86
52		166499/2013	carcassa	Non determinata
53		185515/2013	carcassa	99% 228E
54		297912/2013	borsa	Non determinata
55		297932/2013	borsa	100% Transmune
56		297943/2013	borsa	Non determinata
57		304011/2013	card	99% IT03
58		309372/2013	carcassa	100% Vaxxitech
59		340767/2013	borsa	100%Vaxxitech
60		348495/2013	card	97,6% DV86
61		14508/2014	carcassa	99,8% Transmune
62		35648/2014	card	96,9% DV86
63		46453/2013	card	99,8% Bursine
64		58895/2014	card	99% D78

Nr	Regione Italiana	N.Darwin/IZSLER	campione	Risultati sequenziamento
65	Sicilia	71064/2012	borsa	97,4% DV86
66		271384/2012	borsa	99,2% D78
67		271392/2012	borsa	99,6% D78
68		355847/2013	borsa	97% DV86
69		7317/2014	carcassa	98% ceppo 3529/92 in blast
70		42481/2014	borsa	Sequenza mista
71		42485/2014	borsa	97,1% DV86 98% 3529/92
72		52840/2014	borsa	98% DV86
73	Marche	93772/2912	borsa	91,3% 228E
74		115544/2012	borsa	96,6% DV86
75		120090/2012	borsa	98,4% D78
76		120110/2012	borsa	98,3% DV86
77		195501/2012	Borsa	97,5% DV86
78		195514/2012	carcassa	Non determinata
79		195516/2012	carcassa	96,1% DV86
80		195522/2012	borsa	98,6% D78
81		195527/2012	borsa	98,8% D78
82		195586/2012	borsa	97,3% D78
83		212662/2012	carcassa	99,6% DV86
84		95714/2013	card	100% Transmune
85		139146/2013	card	100% Vaxxitech
86		151153/2013	card	99,4% 228E
87		323479/2013	card	97,2% DV86
88		10429/2014	card	97% ceppo Ks in blast
89	Veneto	130808/2013	card	95,6% DV86
90		302883/2013	card	99% IT03
91		355835/2013	borsa	92,4% Transmune
92		23022/2014	card	88,6% DV86 95% MG8

In Figura n.3 è rappresentato l'albero filogenetico dei ceppi italiani in cui si vede come i quattro ceppi omologhi al ceppo IT03 rappresentano un cluster unico e ben distinto dai ceppi "very virulent".

**Figura 3:** dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del gene VP2 dei ceppi di IBDV campionati in Italia oggetto dello studio. I ceppi sono confrontati con le sequenze del pannello di virus utilizzati come riferimento nell'analisi di routine (♦) e con ceppi disponibili in GeneBank (●)



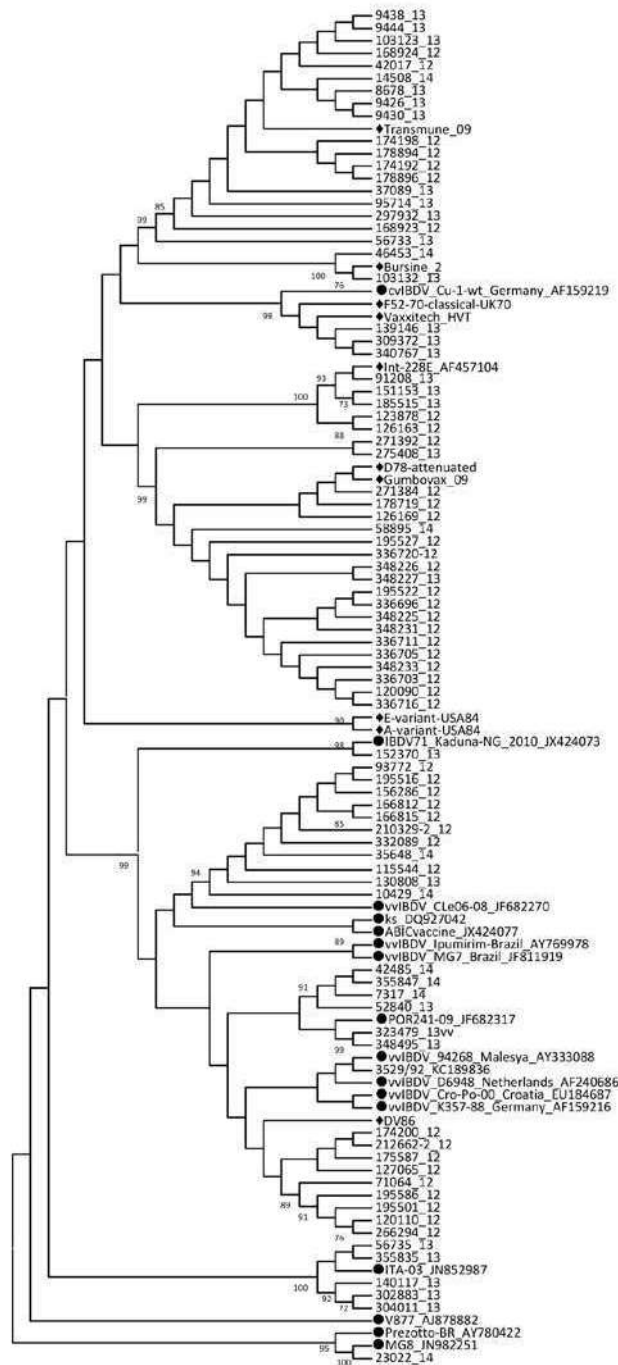
I risultati dell'attività di sequenziamento dei 52 ceppi provenienti da Paesi esteri sono riportati nella Tabella n.2. L'analisi molecolare ha messo in evidenza che 31 virus hanno presentato una maggiore omologia nei confronti del ceppo vvDV86; 11 virus verso i ceppi vaccinali ( V78 vaccine, Transmune; Vaxxitek) e 10 ceppi verso vari ceppi vv ( CLe 06-08, V887, MG8, ANA Prezotto-Brasilian, Ks,3529/92).

**Tabella 2-**risultati del sequenziamento di 52 ceppi di IBDV campionati in 15 Paesi Esteri

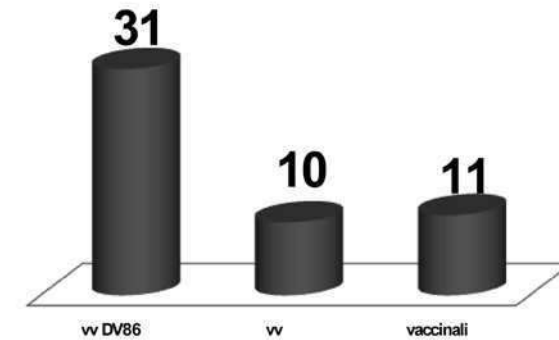
	<b>Paesi esteri</b>	<b>Anni 2012-2013</b>	<b>campione</b>	<b>risultati sequenziamento</b>	<b>N° Darwin/IZSLER</b>
1	Federazione Russa		FTA cards	91,3% 228E	104708/2012
2	Federazione russa		FTA cards	97% V78/ABIC vaccine in blast	124021/2013
3	Federazione Russa		FTA cards	97% V78/ABIC vaccine in blast	124034/2013
4	Federazione Russa		FTA cards	90,9% DV86	175029/2013
5	Federazione Russa		FTA cards	90,8% DV86	175040/2013
6	Federazione Russa		FTA cards	97,6% DV86	256464/2013
7	Federazione Russa		FTA cards	97,6% DV86	256466/2013
8	Federazione Russa		FTA cards	95,7% DV86	256468/2013
9	Ungheria		Borsa	99,4% Transmune	184928/2012
10	Ungheria		borsa	98,8% DV86	44434/2013
11	Ucraina		borsa	99% VT877 due virus	201899/2012
12	Ucraina		FTA cards	100% Transmune	341351/2012
13	Ucraina		FTA cards	96% DV86 e 98% ceppo CLE 06-08 in blast	241238/2013
14	Ucraina		FTA cards	96% DV86 e 98% ceppo CLE 06-08 in blast	245407/2013
15	Ucraina		FTA cards	99% V887	317459/2013
16	Regno Unito		FTA cards	99,8% Transmune	324185/2012
17	Regno Unito		FTA cards	100% Transmune	324193/2012
18	Regno Unito		FTA cards	96,5% DV86	324223/2012
19	Olanda		FTA cards	99,4% DV86	341442/2012
20	Olanda		FTA cards	99,2% DV86	341442/2012
21	Serbia		borsa	97,9% DV86	51494/2013
22	Rep.Ceca		borsa	99,6% DV86	77185/2013
23	Giordania		FTA cards	96,5% DV86	78796/2013
24	Giordania		FTA cards	96,6% DV86	78814/2013
25	Giordania		FTA cards	96,4% DV86 4 virus	165765/2013
26	Giordania		FTA cards	97% POR241/09 (JF682317) in blast	200559/2013
27	Giordania		FTA cards	97,6% DV86	340833/2013
28	Giordania		FTA cards	95,7% DV86	340844/2013
29	Giordania		FTA cards	98% ceppo CLe 06-08 in blast	3113/2014
30	Giordania		FTA cards	98% ceppo CLe 06-08 in blast	3125/2014
31	Giordania		FTA cards	98% ceppo CLe 06-08 in blast	3136/2014
32	Libano		FTA cards	94,9% DV86	78846/2013
33	Libano		FTA cards	96,1% DV86	78850/2013
34	Libano		FTA cards	95,7% DV86	78854/2013
35	Emirati Arabi		FTA cards	96% MG8	98711/2013
36	Emirati Arabi		FTA cards	96% MG8	98713/2013
37	Malta		borsa	95% ceppo ANAY780422 Prezotto-Brasilian	123940/2013
38	Arabia Saudita		FTA cards	97,2% Trasmune	134587/2013
39	Arabia Saudita		FTA cards	96,3% DV86	262559/2013
40	Arabia Saudita		FTA cards	96% MG8 (JN982251) in blast	358809/2013
41	Arabia Saudita		FTA cards	97% ceppo Ks in blast	358812/2013
42	Tunisia		FTA cards	98% DV86	248344/2013
43	Tunisia		FTA cards	97% DV86	248367/2013
44	Tunisia		FTA cards	97,9% DV86	248378/2013
45	Tunisia		FTA cards	98% DV86	22314/2014
46	Tunisia		FTA cards	98,1% DV86	22315/2014
47	Tunisia		FTA cards	98% DV86	22316/2014
48	Tunisia		FTA cards	97,3% DV86 e 98% 3529/92	36209/2014
49	Tunisia		FTA cards	97,3 DV86 e 98% 3529/92	36211/2014
50	Marocco		FTA cards	100% Vaxxitek	5270/2014
51	Marocco		FTA cards	100% Vaxxitek	11682/2014
52	Camerun		FTA cards	97,5% DV86 2 virus	153384/2014

In Figura n.4 è rappresentato l'albero filogenetico dei ceppi dei Paesi Esteri

**Figura 4:** dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del gene VP2 dei ceppi di IBDV campionati in paesi Esteri oggetto dello studio. I ceppi sono confrontati con le sequenze del pannello di virus utilizzati come riferimento nell'analisi di routine (♦) e con ceppi disponibili in GeneBank (●)



**Figura 5:** risultato della genotipizzazione dei ceppi IBDV dei Paesi esteri: 31 ceppi vv DV86, 11 ceppi vaccinali, 10 ceppi vv vari



## DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine molecolare dei virus italiani mostrano una diffusione dei virus very virulent in zone geografiche ben definite che riguardano in particolare la Romagna, le Marche, qualche provincia della Sicilia e del Veneto. I virus varianti very virulent sono risultati il 28,26 % e in Romagna i virus "very virulent" sono risultati il 30,7% dei virus isolati. Tutti i virus identificati in Lombardia sono risultati essere ceppi vaccinali (mild e intermediate). Quattro dei virus di campo isolati sono risultati essere simili (omologia del 99%) al virus variante "non virulent" IT03 già segnalato da Bonci et al. nel 2012, di cui 3 identificati in Romagna ed 1 in Veneto. Questi virus non provocano la malattia manifesta ma possono causare lesioni microscopiche alla borsa di Fabrizio ed indurre immunodepressione. Questi virus, inoltre, in quanto varianti, possono eludere l'immunità indotta dalla vaccinazione. Dall'analisi filogenetica risulta che questi quattro virus clusterizzano con il virus IT03 e formano un cluster distinto rispetto agli altri ceppi.

I risultati dell'indagine molecolare condotta su virus isolati da campioni provenienti da Paesi Esteri ci hanno mostrato una altissima prevalenza dei virus "very virulent" con una percentuale dell'82,3%.

I virus "very virulent" sono distribuiti invariabilmente in tutti i paesi controllati: dall'Est Europa, alla Russia, ai Paesi Arabi fino al Nord Africa e paesi del bacino del Mediterraneo.

## CONCLUSIONI

Lo studio presentato ha riguardato la raccolta dei campioni, l'identificazione ed il sequenziamento di 144 ceppi di virus IBDV nell'arco temporale degli ultimi due anni. Di questi 92 ceppi virali erano di origine italiana e 52 di origine da Paesi Esteri. Risulta interessante osservare che circa un terzo dei virus italiani sono "very virulent". Quattro virus, invece, sono risultati essere varianti "non virulent" omologhi per il 99% al virus IT03. Questi tipi virali vanno tenuti in osservazione perché possono eludere l'immunità indotta dai vaccini e determinare problemi di immunodepressione. I restanti virus sono risultati virus vaccinali.

Per quanto riguarda i 52 virus dei Paesi Esteri si osserva come sono fortemente prevalenti i virus “very virulent” rispetto ai ceppi vaccinali. Questo, epidemiologicamente, indica che nei Paesi vicini il virus “vv” della Malattia di Gumboro è altamente presente per cui, nel nostro Paese, risulta di fondamentale importanza continuare ad eseguire una attenta biosicurezza e profilassi vaccinale. In conclusione i test diagnostici che possono identificare i ceppi IBDV classici o varianti, patogeni o non patogeni, sono necessari ai fini della valutazione della diffusione di questo virus nel tempo e per aree geografiche con lo scopo di modularne le strategie di profilassi ( Mahgoub et al., 2012).

## BIBLIOGRAFIA

1. Bonci M., Giovanardi D., Pesente P., Morandini E., Lupini C., Cecchinato M., Rossi G., Catelli E. (2012). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della Bursite Infettiva isolati recentemente in Italia. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2013.
2. -Coulibaly F., Chevalier C., Gutsche I., Pous J., Navaza J., Bressanelli S., Delmas B., Rey F.A. (2005). The Birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral virus. *Cell*. 120:761-772.
3. Etteradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D. & Guittet, M. (1997b). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Arch Virol* 142, 2079–2087
4. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. (2011). Amino acid contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology* 409:33-37.
5. Lukert P.D., Saif Y.M. (1997) Infectious bursal disease. *Disease of Poultry* 10<sup>th</sup> (pp.721-738). Ames: Iowa State University Press.
6. Mahgoub HA., Bailey M., Kaiser P. (2012). An overview of infectious bursal disease. *Arch. Virol.* 11:2047-57.
7. Moreno Martin A., Fallacara F., Barbieri I., Tosi G., Rivallan G., Etteradossi N., Ceruti R., Cordioli P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease virus isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Dis.* 51:863-872.
8. Moreno Martin A., Barbieri I., Ceruti R., Morandini E., Cordioli P. (2010). Caratterizzazione genomica di ceppi di virus della malattia di Gumboro isolati in Italia nel periodo 2006-2009. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 201, pp.199-203.
9. Muller H., Scholtissek C., Becht H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 3, 584-589.
10. Seahorn H., Hofacre C. (2011) *The Poultry Informed professional* 120:1-8-
11. Vakharia V.N., Ahamed B., Snyder D.B. (1994) Molecular basis of antigenic variation infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 31, 265-273.
12. Van den Berg T.P. (2000). Acute Infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*, 29, 175-194.
13. Van den Berg. T.P., Etteradossi N., Toquin D., Meulemans G. (2000). Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease). *Disease of Poultry: World trade and Public Health Implication. OIE Scientific and Technical Review* (pp.509-543) Paris, France.

14. Von Einem U.I., Gorbalenya A.E., Schirmeier H., Behrens S.E., Letzel T., Mundt E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 85, 2221-2229.
15. Woolfe A. et al. (2005) *PloS Biology* 3:116-130

Si ringraziano i tecnici della Sezione di Forlì e del reparto “sequenziamento” della sede IZSLER in Brescia per la preziosa collaborazione.

## MONITORAGGIO DELLA COLONIZZAZIONE E PERSISTENZA DEL VACCINO VIVO ATTENUATO PER *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN RIPRODUTTORI PESANTI

Massi P<sup>1</sup>., Fiorentini L.<sup>1</sup>, Barbieri I.<sup>2</sup>, Giovannetti L.<sup>3</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Sezione di Forlì, via Marchini n.1, Forlì [FC-forli@izsler.it](mailto:FC-forli@izsler.it)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Brescia

<sup>3</sup> Medico Veterinario Libero Professionista

### Summary

*Mycoplasma synoviae* is an important causative agent of avian mycoplasmosis. In the present study *vlhA* gene sequence analysis was applied and verified for typing the *Mycoplasma synoviae* live vaccine MS-H strain and field isolates from farm breeder chickens. This tool was applied for 42 field strains of *M. synoviae* isolated from breeder chickens. This analysis revealed that all the strains presented 100% similarity with *M. synoviae* vaccine strain *Mycoplasma synoviae* -H. Nobody *M. synoviae* field strain was identified. In the same time nobody *Mycoplasma s.* was identified in the second pullets period of life.

### INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma synoviae* è riconosciuto come un patogeno importante per il pollame allevato in tutto il mondo ed è causa di perdite economiche ingenti nell'allevamento avicolo intensivo. Più comunemente l'infezione da *Mycoplasma synoviae* si manifesta come un'infezione subclinica dell'apparato respiratorio superiore. Comunque la malattia respiratoria può manifestarsi in sinergia con altri patogeni e l'infezione sistemica conduce alla forma sinoviale. Dal 2000 è stata segnalata, in Olanda, una nuova forma da *M. synoviae* che provoca lesioni al polo apicale del guscio, determinando importanti danni economici all'industria delle uova da consumo (Feberwee et al., 2009). Il *Mycoplasma synoviae* può trasmettersi per via orizzontale, per contatto diretto e per via verticale attraverso l'uovo. Nel nostro Paese l'infezione si presenta con alta prevalenza nel pollo da carne. Questo rende necessario ricorrere alla vaccinazione quando l'allevamento da riproduzione si infetta per diversi cicli produttivi nonostante l'attuazione delle misure di biosicurezza previste. Attualmente nel nostro Paese è stato consentito l'utilizzo di un vaccino vivo attenuato denominato "MS-H". Il ceppo MS-H *Mycoplasma synoviae* è stato sviluppato per mutagenesi chimica del ceppo di campo Australiano 86079/7NS ed è un vaccino vivo temperatura-sensibile (*ts+*) usato per il controllo dell'infezione da *M. synoviae* nel pollame a livello mondiale. Per il controllo in campo dei ceppi di *Mycoplasma synoviae* e al fine di poter discriminare fra ceppo vaccinale e ceppi di campo si utilizzano varie tecniche di genotipizzazione (Harada et al., 2009) (Ogino et al., 2011). Una di queste è rappresentata dalla analisi della sequenza di un singolo gene: il gene *vlhA*. Lo spirito del seguente studio è stato di valutare la colonizzazione e persistenza del vaccino MS-H in un allevamento di Riproduttori pesanti e di discriminarlo

da eventuali ceppi di campo mediante la tecnica sequenziamento ed analisi del gene *vlhA*. Nel contempo è stata valutata l'eventuale capacità di resistenza ambientale del ceppo vaccinale nell'allevamento di pollastre successivo a quello vaccinato.

### MATERIALI E METODI

Lo studio si è svolto presso un'azienda avicola di Riproduttori pesanti Ross 708 composto da 33.471 femmine e da 3013 maschi distribuiti in 7 capannoni sia in fase di svezzamento che in fase di produzione. I pulcini sono stati accasati in data 29 novembre 2012. I soggetti in questione sono stati controllati sierologicamente in ELISA (Elisa Kit Simbiotic®) e con tamponi tracheali tramite PCR tradizionale per la presenza di *Mycoplasma synoviae* all'età di 40 e 60 giorni risultando negativi. Sono pertanto stati vaccinati con MS-H a 68 giorni di vita con goccia oculare.

Gli animali sono stati controllati dopo 8 settimane dalla vaccinazione al fine di evidenziare la presenza del ceppo vaccinale mediante una PCR tradizionale che amplifica un frammento di 377 bp del gene *vlhA*. I prodotti PCR ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers dell'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye Terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500xl (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASTar). Il confronto delle sequenze con quella di riferimento corrispondente al ceppo vaccinale utilizzato è stato effettuato mediante allineamento multiplo con il programma MEGA 5.

Ogni 2 mesi, fino a 12 mesi dalla vaccinazione, i gruppi venivano saggiati sia sierologicamente sia con tamponi tracheali tramite PCR e sequenziamento per *Mycoplasma synoviae*.

Venivano anche raccolti i dati relativi alle patologie e alle produzioni finali del gruppo in questione.

Nell'allevamento della pulcinaia successiva le pollastre erano saggiate sia sierologicamente che in PCR mediante tamponi tracheali.

### RISULTATI

A 8 settimane post-vaccinazione tutti i gruppi sono risultati positivi in PCR per *Mycoplasma synoviae* e l'estratto di PCR al sequenziamento risultava presentare un'identità nucleotidica del 100% con il ceppo vaccinale MS-H.

I tamponi tracheali risultavano costantemente positivi per tutto il periodo di controllo in PCR ed i successivi sequenziamenti presentavano identità nucleotidica del 100% verso MS-H (figura 2).

**Figura 2.** Dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del gene *vlhA* dei campioni di *M. synoviae* oggetto dello studio in cui si evidenzia che tutti i campioni considerati sono identici al vaccino. ▲: sequenza del ceppo vaccinale utilizzato nello studio; ●: sequenza outgroup.



Sierologicamente i gruppi presentavano sieroconversione alta a partire da 10 settimane post vaccinazione e si mantenevano sieropositivi alti anche se con leggera flessione fino alla fine del periodo di osservazione.

Il gruppo registrava una mortalità finale dello 0,18% con una produzione a 65 settimane di vita di 177 uova per gallina ed una percentuale di uova incubate del 96,88%.

Nell'allevamento della pulcinaia successiva le pollastre risultavano negative sia sierologicamente che in PCR tradizionale per *Mycoplasma synoviae*.

## DISCUSSIONE

Il gruppo vaccinato ha presentato ottime performances produttive e non ha messo in evidenza problemi sanitari. Il controllo degli animali vaccinati tramite monitoraggio sierologico e sequenziamento di una porzione del gene *vlhA* si è protratto per 12 mesi dal momento della vaccinazione ed ha mostrato la presenza dello stesso ceppo vaccinale in tutti i capannoni per tutto il periodo produttivo. Contemporaneamente non è stata riscontrata la presenza di altri Mycoplasmi. La pulcinaia riutilizzata successivamente non è risultata colonizzata dal vaccino utilizzato nel ciclo precedente.

## CONCLUSIONI

In accordo con altri Autori ( Bayatzadeh et al., 2014) si evidenzia come la tecnica della tipizzazione molecolare che sfrutta il sequenziamento del gene *vlhA* risulti estremamente utile nel monitoraggio dei gruppi vaccinati al fine di distinguere i ceppi di *M. synoviae* di campo da quelli vaccinali, al contrario delle tecniche sierologiche in Elisa che non ci permettono di distinguere gli anticorpi da vaccinazione da quelli da infezione.

In conclusione si può affermare che la vaccinazione con vaccino termosensibile MS-H in Riproduttori pesanti risulta avere colonizzato in modo persistente gli animali, avere protetto gli stessi dall'infezione da *Mycoplasma synoviae* e di non essere residuo nell'allevamento da pollastra utilizzato per il ciclo di allevamento successivo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bayatzadeh MA., Pourbaksh SA., Ashtari A., Abtin AR., Abdoshah M.( 2014).Molecular typing of Iranian isolates *Mycoplasma synoviae* and their differentiation from the live commercial vaccine strain MS-H using *vlhA* Gene. Br Poult Sci. Jan 10.(Epub ahead of print).
2. Feberwee A., Morrow C.J., Ghorashi S.A., Noormohammadi A.H., Landman W.J.M.( 2009).Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466.Avian Pathology.38(5), 333-340.
3. Harada K, Tanaka MK, Uchiyama M, Yamamoto T, Oishi K, Arao M, Takahashi T.( 2009) Molecular typing of Japanese field isolates and live commercial vaccine strain of *Mycoplasma synoviae* using improved pulsed-field gel electrophoresis and *vlhA* gene sequencing.Avian Disease vol.53,N.4 :538-543.
4. Ogino S, Munakata Y, Ohashi S, Fukui M, sakamoto H, Sekiya Y, Noormohammadi AH, Morrow CJ.(2011)Genotyping of Japanese field isolates of *Mycoplasma synoviae* and rapid molecular differentiation from the MS-H vaccine strain.Avian Disease vol.55 N.2: 187-194.



**RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELL'INFEZIONE  
DA SALMONELLA ENTERITIDIS IN DUE GRUPPI DI GALLINE  
OVAIOLE DI 45 E 65 SETTIMANE DI VITA SOTTOPOSTE A DUE  
DIFFERENTI PROGRAMMI VACCINALI**

Massi P.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Longoni C.<sup>2</sup>, Russo E.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertyni"-Sezione di Forlì-via Marchini 1-Forlì(FC)-forli@izsler.it

<sup>2</sup> MSD Animal Health S.r.l.

**Summary**

The aim of this study was to examine the duration of immunity of different vaccination schemes using a *S. enteritidis* live vaccine and a *S. enteritidis* inactivated vaccine in one group and a *S. enteritidis* live vaccine and a *S. enteritidis*-*S. typhimurium* inactivated vaccine in a second group of layers. Two groups of Lohman Brown chickens were used. Group one (A) was vaccinated two times orally with *S. enteritidis* live vaccine and once i.m. with *S. enteritidis*-*S. typhimurium* inactivated vaccine with an half dose at 14 weeks. Group two (B) was vaccinated two times orally with *S. enteritidis* live vaccine at 3 and 30 days and once i.m. with *S. enteritidis* inactivated vaccine at 14 weeks. Ten layers randomly selected from each of the groups were transferred in laboratory and challenged with a *S. enteritidis* field strain in 45 and 65 weeks of age. In one month we had got an estimation of the impact of challenge on faecal shedding and organ and egg contamination for *Salmonella enteritidis*.

**INTRODUZIONE**

Negli ultimi vent'anni la *Salmonella enterica* subspecie *enterica* sierovariante *enteritidis* è stata la causa maggiore di tossinfezione alimentare batterica umana dovuta al consumo di uova contaminate e di ovoprodotti. Al fine di prevenire l'infezione da *S. enteritidis* nel pollame, e pertanto, minimizzare le infezioni umane, sono state intraprese un certo numero di strategie, come il miglioramento della biosicurezza, la lotta ai roditori, la somministrazione di pre e probiotici, l'utilizzo della vaccinazione. In molti Paesi la vaccinazione delle galline ovaiole è stata implementata di pari passo ai programmi di controllo nazionali per salmonella, tanto che negli ultimi anni in Europa si è registrata una netta riduzione dei casi di infezione umana. Attualmente sono disponibili vaccini vivi attenuati e vaccini inattivati per *S. enteritidis* (Penha et al., 2009).

Diversi sono gli studi che dimostrano una riduzione dell'escrezione fecale da *S. enteritidis* utilizzata per il challenge in animali vaccinati e pochi sono quelli che riportano gli effetti della vaccinazione sulla riduzione della contaminazione dell'uovo ( Okamura et. Al., 2007). Soprattutto pochi sono i lavori che prendono in considerazione l'eliminazione fecale, la contaminazione del guscio, la replicazione negli organi bersaglio (fegato, ovaio e intestino) diverse settimane dopo l'applicazione di schemi vaccinali in varie combinazioni. (Springer et al., 2011)

Per questo motivo sono state eseguite due prove di infezioni sperimentali con un ceppo di campo di *Salmonella enteritidis* su due gruppi di ovaiole con due diversi schemi vaccinali al fine di verificare l'efficacia vaccinale e l'immunità a 45 e 65 settimane di

vita. (Arnold et al., 2014). Gli animali oggetto della prova erano prelevati dallo stesso allevamento, trasferiti nello stabulario della Sezione di Forlì-IZSLER- dove veniva eseguita l'infezione e dove venivano eseguiti accertamenti di laboratorio con lo scopo di verificare l'eliminazione, la colonizzazione e la replicazione del ceppo di *Salmonella enteritidis* usato per il challenge.

**MATERIALI E METODI**

Venivano controllati due gruppi di animali accasati il 15 marzo 2013 per un totale di 34.000 capi allevati in gabbia nello stesso capannone ma vaccinati per *Salmonella* con due schemi vaccinali diversi per *Salmonella*. Per ognuna delle prove venivano utilizzate 10 galline per gruppo selezionate a random. I due gruppi erano identificati come gruppo A e gruppo B e gli schemi vaccinali per salmonella sono riportati come di seguito:

	3 gg	30 gg	14 settimane
Gruppo A	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.inattivato <i>S. enteritidis</i> e <i>typhimurium</i> mezza dose
Gruppo B	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.attenuato <i>S. enteritidis</i> idro	v.inattivato <i>S. enteritidis</i>

Le pollastre sono state svezzate in capannoni separati nello stesso allevamento, quindi i gruppi (gruppo A e gruppo B) sono stati mantenuti separati al trasferimento nell'allevamento di deposizione. Al momento del trasferimento in laboratorio gli animali, prima di ogni prova, sono stati sottoposti ad esami batteriologici su tamponi cloacali e ad un controllo sierologico per *S. enteritidis* (Elisa Kit Idexx®), *typhimurium* (Elisa Kit X-OVO Flockgreen™) e *pullorum-gallinarum* (S.A.R. con Ag. *pullorum* IZSLER). Prima dell'introduzione in isolatori le galline sono state sottoposte ad infezione per via orale, con sondino endoesofageo, con un ceppo di campo patogeno di *S. enteritidis* conservato in Biobanca presso la Sezione IZSLER di Forlì con il numero identificativo 229389/2013. Nella prima prova a 45 settimane di vita la dose infettante utilizzata è stata di 10<sup>7</sup> ufc/ml/capo e nella seconda prova a 65 settimane la dose infettante utilizzata è stata di 10<sup>5</sup> ufc/ml/capo. Per entrambe le prove le galline sono state tenute in osservazione per 4 settimane per le lesioni cliniche, sono state controllate con tamponi cloacali ogni 7 giorni, sono state controllate le uova deposte mediante esame batteriologico in pool per giornata di deposizione e a fine prova sono state controllate sierologicamente, quindi sacrificate, sottoposte ad esame anatomopatologico ed al controllo batteriologico sugli organi bersaglio identificati in: intestino, fegato e ovaio. L'esame batteriologico sulle uova è stato eseguito separatamente sul tuorlo e sul guscio. Gli esami batteriologici sono stati eseguiti con metodo ISO 6579/Amd1: 2007.

**RISULTATI**

Nelle due prove di infezione eseguite nessun animale mostrava una sintomatologia clinica apprezzabile. Dal punto di vista anatomopatologico si osservavano soggetti con ovarite fibrinosa ed involuzione ovarica in due soggetti del gruppo A nella prima prova ed involuzione ovarica in tre soggetti del gruppo A e due soggetti del gruppo B nella seconda prova.

I risultati di laboratorio sono riportati come di seguito:

- Esami batteriologici eseguiti su tamponi cloacali nella prima prova

	7gg.post infezione n°positivi/campioni saggiati	14gg.post infezione n°positivi/campioni saggiati	21gg.post infezione n°positivi/campioni saggiati	% positività
Gruppo A	0/10	0/10	1/10	3,33%
Gruppo B	0/10	0/10	0/10	0%

- Esami batteriologici eseguiti su tamponi cloacali nella seconda prova

	7gg.post infezione n°positivi/campi oni saggiati		14gg.post infezione n°positivi/campio ni saggiati		21gg.post infezione n°positivi/campio ni saggiati		28gg.post infezione n°positivi/campio ni saggiati		Positività % media
Gruppo A	6/10	60%	8/10	80%	3/10	30%	3/10	30%	50%
Gruppo B	3/10	30%	1/10	10%	0/10	0%	1/10	10%	12,5%

- Esami batteriologici sulle uova nelle due prove

Le positività batteriologiche sono state riscontrate solo nel guscio

	Prima prova 45 settimane n°positivi/campioni saggiati	% prevalenza della positività	Seconda prova 65settimane n°positivi/campioni saggiati	% prevalenza della positività
Gruppo A	5/23	21,7%	3/23	13%
Gruppo B	2/23	8,69%	0/23	0%

- Esami batteriologici da organi a 28 gg.post infezione (prima prova)

	<b>Fegato</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Ovaio</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Intestino</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività
Gruppo A	7/10	70%	6/10	60%	9/10	90%
Gruppo B	1/10	10%	1/10	10%	1/10	10%

- Esami batteriologici da organi a 28 gg.post infezione (seconda prova)

	<b>Fegato</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Ovaio</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività	<b>Intestino</b> n°positivi/ campioni saggiati	% positività
Gruppo A	6/10	60%	4/10	40%	2/10	20%
Gruppo B	3/10	30%	1/10	10%	2/10	20%

- Esami sierologici prima prova (45 settimane)

Pre prova	Salmonella sp	Gruppo A		Gruppo B	
	S. pullorum	6/20		20/20	
	S. enteritidis	18/20	90%	13/20	65%
	S. typhimurium	1/20		3/20	
Fine prova					
	S. pullorum	5/10		6/10	
	S. enteritidis	9/10	90%	6/10	60%
	S. typhimurium	2/10		0/0	

- Esami sierologici seconda prova ( 65 settimane)

Pre prova	Salmonella sp	Gruppo A		Gruppo B	
	S. pullorum	10/10		10/10	
	S. enteritidis	10/10	100%	5/10	50%
	S. typhimurium	1/10		4/10	
Fine prova					
	S. pullorum	10/10		10/10	
	S. enteritidis	10/10	100%	9/10	90%
	S. typhimurium	8/10		7/10	

## DISCUSSIONE

Le prove effettuate mettono in evidenza delle caratteristiche di artificiosità in quanto non si conoscono tutte le possibili variabili di campo dei due gruppi compreso l'applicazione dei due schemi vaccinali per salmonella. In entrambe le prove, nonostante l'alto titolo infettante e la distanza temporale dall'applicazione vaccinale e la residua memoria immunitaria da vaccino, i due gruppi non hanno manifestato malattia o sintomi clinici rilevanti, una bassa (gruppo A) o nulla (gruppo B) contaminazione del guscio, una media (gruppo A) o bassa (gruppo B) contaminazione fecale ed infine una media colonizzazione da Salmonella nella prima prova, una bassa colonizzazione nella seconda prova degli organi bersaglio per il gruppo A, mentre si evidenzia una bassa colonizzazione degli organi bersaglio in entrambe le prove per il gruppo B. Dal punto di vista sierologico risultano imprecise le interpretazioni che si possono esplicitare a causa della scarsa specificità dei metodi sierologici utilizzati per Salmonella (Barrow, 1992) e per la notevole capacità di dei diversi sierotipi di Salmonella di sieroconvertire in maniera

crociata. L'unica considerazione utile che scaturisce dai risultati sierologici rilevati è che la sola risposta anticorpale non è sufficiente a proteggere dall'infezione.

In conclusione le due prove sono state fortemente condizionate dal titolo infettante elevato utilizzato nel challenge, dalla lontananza delle vaccinazioni, dagli schemi vaccinali impostati dal Veterinario aziendale che non ha seguito le indicazioni dettate dalle case produttrici dei vaccini utilizzati che hanno visto combinare due dosi di vaccino vivo attentato con una dose di vaccino inattivato in un gruppo e due dosi di vaccino vivo attenuato con mezza dose di vaccino bivalente inattivato nel secondo gruppo. Si ricorda che per il vaccino inattivato utilizzato nel gruppo A la casa produttrice dichiara una protezione immunitaria fino a 56-60 settimane di età con la doppia vaccinazione a dose intera; per il vaccino inattivato utilizzato nel gruppo B la casa produttrice dichiara una protezione soddisfacente fino alla 17 settimana dopo la seconda vaccinazione. In particolare per il gruppo A si deve considerare che il vaccino inattivato bivalente è stato utilizzato a metà dose. Questo significa ridurre ulteriormente la capacità di prolungare nel tempo la risposta immunitaria specifica per *S. enteritidis* proprio come conseguenza di un'applicazione troppo distante da quanto indicato dalla casa produttrice dello stesso vaccino.

#### CONCLUSIONE

In conclusione si può affermare che non esistono molti lavori scientifici che valutano l'efficacia dell'applicazione di diverse combinazioni vaccinali per Salmonella e la loro capacità di prolungare così a lungo la risposta immunitaria specifica, come invece hanno dimostrato le due prove di challenge eseguite con ceppo di campo di *Salmonella enteritidis* con alto titolo infettante ed a così elevata distanza dalle vaccinazioni ed in un caso con l'uso un vaccino inattivato a metà dose.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Arnold ME., Gosling RJ., La Ragione RM., Davies RH., Martelli F. 2014. Avian Pathol. Mar 24.
2. Barrow P.A. 1992. ELISAs and serological analysis of salmonella infections in poultry: a review. Epidemiol. Infect. 109, 361-369.
3. Okamura M., Tachizaki H., Kubo T., Kikuchi S., Suzuki A., Takehara K., Nakamura M. 2007. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. Vaccine 25, 4837-4844.
4. Penha Filho Ra., de Paiva JB., Arguello YM., da Silva MD., Gardin Y., Resende F., Berchieri Junior AB., Sesti L., 2009. Avian Pathol. 38(5):367-75.
5. Springer S., Lindner T., Ahrens M., Woitow G., Prandini F., Selbitz HJ. 2011. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 124(3-4):89-93.

#### CIRCOLAZIONE DI UN NUOVO GENOTIPO DI VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA

Moreno A.<sup>1</sup>, Ceruti R.<sup>2</sup>, Boniotti B.<sup>1</sup>, Gavazzi L.<sup>2</sup>, Fasoli P.<sup>3</sup>, Cordioli P.<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, via Bianchi, 9 – 25124, Brescia
- <sup>2</sup> Gesco Consorzio Coop., Via Bonfandina, 9 – Cazzago San Martino, Brescia
- <sup>3</sup> Avicola Alimentare Monteverde SRL, Via San donato, 107 – Rovato, Brescia

#### Summary

This study reported for the first time the circulation in Italy since 2012 of IBV strains closely related to IBV/Guandong/Xindadi/0903 isolated in China. The description of clinical forms, virus isolation, sequencing of S1 gene and phylogenetic and molecular analysis of four cases detected in the period 2012 - 2014 were here described. The phylogenetic analysis showed that the Italian and Chinese strains formed a clearly distinguishable group within the A2 genotype, which included the QX strain widely isolated in Europe and China. The major part of strains belonging to this genotype were nephropathogenic, however the group here described was associated with respiratory forms without renal involvement. The full-length S1 gene of two Italian strains was sequenced and along with other full-length IBV genomes available from GenBank, IBV/Guandong/Xindadi/0903 included, was analyzed for recombination. Evidence of recombination was found in the Italian and Chinese strains in the S1 protein being identified the QX and 4/91 sequences as major and minor parents. These results demonstrated the circulation of a new IBV variant closely related to IBV strains isolated in China probably originated as result of a recombination event between QX and 4/91 strains. Permanent monitoring of circulating strains would be advisable in order to rationally modify vaccination strategies to make them appropriate to the field situation.

#### INTRODUZIONE

La bronchite infettiva aviare, patologia a diffusione mondiale, causa ogni anno notevoli problemi sia sanitari che economici per il settore avicolo italiano. Le perdite economiche sono in parte dovute alla notevole variabilità antigenica dei ceppi virali coinvolti che, malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti con il ceppo classico M41 e con il ceppo 4/91 (793B), continuano a determinare la comparsa di forme cliniche. Anche il tropismo virale diviene sempre più variabile e si manifesta con differenti forme cliniche, dalle respiratorie o renali più frequenti nei broilers a quelle caratterizzate da calo di ovodeposizione ed alterazione della qualità del guscio tipiche di ovaiole e riproduttori. A partire del 1956 (3), si sono progressivamente identificati nuovi sierotipi o varianti di virus della bronchite infettiva aviare (IBV) nei vari continenti, isolati anche da polli vaccinati con il ceppo classico Massachusetts. A tutt'oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi e, tuttavia, si pensa che solo una piccola parte di quelli esistenti sia stata individuata. L'elevata variabilità del virus, classificato come gamma coronavirus, sarebbe riconducibile fondamentalmente

alle modificazioni che si verificano a carico di una sola proteina strutturale, la proteina S degli spikes, ed in particolare della S1, una delle due sub-unità che la compongono. La continua comparsa di nuove varianti antigeniche può però rendere problematica la realizzazione di adeguate profilassi immunizzanti e, per questo motivo, le indagini epidemiologiche indirizzate alla caratterizzazione dei ceppi IBV isolati in ogni territorio risultano di notevole importanza nella scelta di programmi vaccinali in grado di conferire una buona protezione. Lo scopo del presente lavoro è segnalare nel nostro paese la presenza dal 2012 di un nuovo genotipo correlato con il ceppo IBV/Guandong/Xindadi/0903 descritto per la prima volta in Cina (2) e di fornire dati sulle caratteristiche genomiche e le forme cliniche osservate.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Sono stati analizzati campioni di trachee di broilers con forme respiratorie prelevati da 1 allevamento rurale e 4 allevamenti industriali. In tutti i casi la sintomatologia clinica era esclusivamente respiratoria caratterizzata da dispnea, rantoli acuti, scolo nasale, anoressia ed aumento di mortalità.

Le caratteristiche dei campioni sono le seguenti:

1- campioni da un allevamento rurale sito nel comune di Montichiari (BS) prelevati nel 2012. L'esame anatomo-patologico rilevava presenza di tracheite fibrinosa e sinusite purulenta.

2- campioni provenienti da un allevamento di broilers sito nel comune di Verona prelevati in Dicembre 2013. La forma clinica è comparsa all'età di 22-23 gg e si è manifestata per 9 gg. con una mortalità finale del 9 % dovuta a complicazioni secondarie da metapneumovirus aviare. Le lesioni più evidenti erano tracheite e sinusite catarrale.

3- campioni provenienti da un allevamento industriale di broilers sito nel comune di Leno (BS) prelevati in gennaio 2014. La forma clinica è comparsa a 28 gg con infiammazione catarrale a livello di trachea e bronchi e sindrome della testa gonfia. La mortalità ha raggiunto il 10% in seguito a complicanze virali e batteriche.

4- campioni originati da un allevamento di broilers nel comune di Forlì (FC) prelevati in due momenti diversi, gennaio e febbraio 2014. Sintomi e lesioni si sono manifestati a 15-16 gg con problemi respiratori e presenza di essudato catarrale in trachea. La mortalità a fine episodio è risultata elevata (19%) a causa della presenza di *E. coli* setticemico.

### *Analisi filogenetica e molecolare e isolamento virale*

L'RNA totale è stato estratto dal materiale patologico, utilizzando trizol reagent (Invitrogen, USA) come da istruzioni. L'RNA così estratto è stato sottoposto a reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (1) del virus, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®). Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state

analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 5 (5) utilizzando il metodo neighbour-joining, modello Tamura-Nei. Le topologie evidenziate sono state confermate con i metodi maximum likelihood e maximum parsimony.

Su due ceppi scelti isolati nel 2012 e 2014 è stato eseguito il sequenziamento completo del gene S1 utilizzando dei primer disegnati sulla base dell'allineamento delle sequenze dei ceppi di riferimento più simili. L'analisi molecolare delle sequenze aminoacidiche della proteina S1 completa è stato eseguito facendo un confronto con il ceppo prototipo M41.

Le sequenze nucleotidiche complete della S1 sono state sottoposte ad un'analisi di ricombinazione utilizzando il programma RDP3 (4) utilizzando i metodi RDP, BOOTSCAN, GENECONV e MAXCHI. Al fine di ottenere una stima conservativa, è stato accettato un evento di ricombinazione solo quando evidenziato da almeno tre metodi implementati nel programma d'analisi. In tutte le analisi la soglia di significatività statistica è stata posta a valori di  $P=0.05$ .

Per l'isolamento virale, i campioni sono stati in seguito inoculati in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo SPF di 9-11 gg di età. La crescita virale è stata confermata tramite RT-PCR e valutazione della comparsa di lesioni tipiche sugli embrioni di pollo.

## RISULTATI

### *Isolamento Virale e identificazione di altri agenti respiratori*

Gli esami virologici e batteriologici hanno rilevato la presenza dei seguenti ceppi:

1- ceppo IBV isolato dai campioni provenienti da polli rurali identificato come Italy/243746/2012. La ricerca di altri agenti eziologici ha rilevato la presenza di *Mannheimia haemolytica*.

2- ceppo originato dai campioni dell'allevamento di Verona codificato con il n. Italy/14810/2014. La ricerca di altri agenti respiratori ha rilevato la presenza di metapneumovirus aviare.

3- ceppo IBV Italy/8318/2014 isolato dall'allevamento di Leno. Dai campioni è stato inoltre identificato metapneumovirus aviare e *E. coli*.

4- dai campioni provenienti dall'allevamento di Forlì non è stato possibile isolare i ceppi IBV dopo tre passaggi su uova embrionate di pollo. L'esame batteriologico ha individuato un *E. coli* setticemico. Gli estratti originali risultati positivi alla RT-PCR per IBV sono stati codificati con i n. Italy/14847/2014 e Italy/42599/2014 rispettivamente per i campioni prelevati in gennaio e febbraio 2014.

### *Analisi filogenetica e molecolare*

L'albero filogenetico è stato costruito sulle sequenze nucleotidiche della regione iper-variabile della S1 dei ceppi italiani di campo e dei ceppi di riferimento rappresentativi dei genotipi più rilevanti. L'analisi filogenetica ha rilevato la presenza di un cluster ben differenziato formato da i ceppi italiani altamente

correlati con un ceppo IBV isolato in Spagna nel 2012 ed il ceppo IBV/Guandong/Xindadi/0903 (XD3) descritto per la prima volta in Cina. Tale gruppo, anche se chiaramente distinguibile, forma parte di un genotipo descritto in Cina ed identificato come A2 type che raggruppa al suo interno i ceppi di riferimento A2 e QX. Gli altri genotipi identificati sono 4/91, M-41, IT02, 624-I/Q1, B1648, D274 e D1466 (figura n.1). I ceppi isolati nel 2014 presentano un'elevata percentuale di omologia tra di loro (99,7-100%) che è leggermente più bassa (96,1-96,3%) nei confronti del ceppo isolato nel 2012. L'analisi in BLAST ha evidenziato che la maggior percentuale di omologia dei ceppi italiani è verso il ceppo XD3 (95,5-95,8%) mentre che verso il ceppo QX e 4/91 è inferiore ma sopra l'89% (89,2-90,3% verso il QX e 89,2-89,8% verso il 4/91).

L'analisi filogenetica della S1 completa dei due ceppi scelti (Italy/243746/2012 e Italy/8318/2014) ha confermato la topologia evidenziata e la clusterizzazione all'interno del genotipo A2. L'analisi molecolare della sequenza aminoacidica della proteina S1 completa è stato eseguito comparando le sequenze italiane con quelle dei ceppi di riferimento. Questa analisi ha rilevato una delezione di 2 aminoacidi in posizione 21A, 21AA (numerazione M41) nel ceppo italiano del 2012 non riscontrata negli altri ceppi. Inoltre è stato evidenziato che la sequenza aminoacidica della S1 dei ceppi italiani e del ceppo XD3 presenta tre diversi pattern di omologia: la parte iniziale e la finale presentano un'elevata omologia con il ceppo di riferimento QX mentre la parte centrale presenta una maggiore similitudine con il ceppo 4/91.

L'analisi della ricombinazione ha confermato la presenza di un evento di ricombinazione, confermato con tutti i metodi utilizzati, per i due ceppi italiani e il ceppo XD3. In tutti i tre casi le sequenze di QX e 4/91 sono state identificate rispettivamente come parentale maggiore e minore ma sono state identificate delle differenze nei breakpoint tra i ceppi italiani e il ceppo cinese. Infatti nei primi, il breakpoint si localizza tra i nt 875-893 e 1045-1065 rispettivamente per i ceppi italiani del 2014 e 2012; nel secondo, il breakpoint è più ampio e è situato tra i nt 881 e 1315. (figura n.2).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo lavoro segnala la circolazione dal 2012 di ceppi IBV altamente correlati con un ceppo XD3 descritto per la prima volta in Cina nella provincia di Guandong nel 2009. Questi ceppi formano un sottogruppo chiaramente differenziato all'interno del genotipo A2 che è costituito principalmente da ceppi IBV nefropatogenici come il ceppo QX diffuso in Cina e in molti paesi europei (2). Al contrario, il ceppo XD3 e i ceppi italiani si caratterizzano per determinare forme cliniche respiratorie senza il coinvolgimento del sistema renale con sintomatologia clinica non molto grave ma complicata dalla presenza di altri agenti virali o batterici determinano un aumento della mortalità fino a raggiungere valori del 19% nell'allevamento di Forlì.

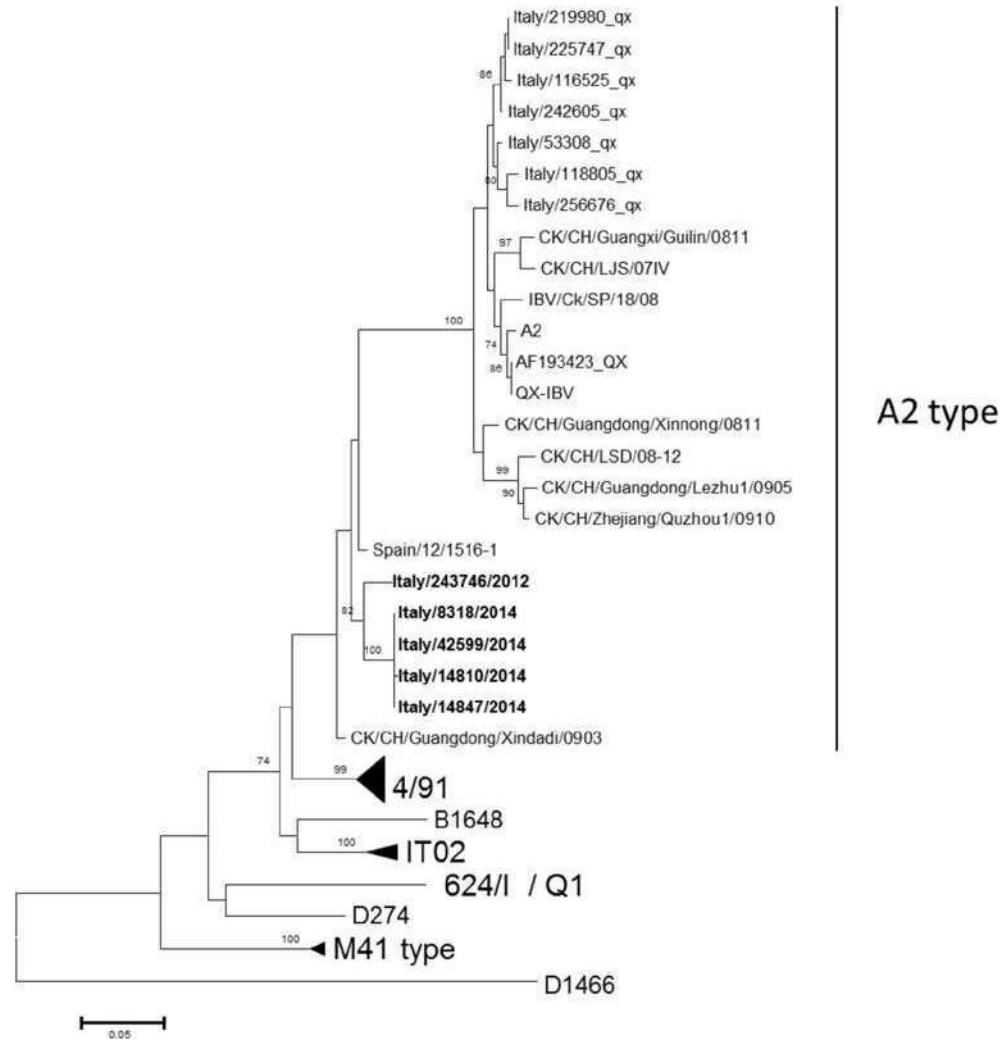
Questo studio ha rilevato inoltre la presenza di un evento di ricombinazione nella proteina S1 nei ceppi italiani e XD3, essendo stati rispettivamente identificati i ceppi QX e 4/91 come parentali maggiore e minore. I due ceppi italiani hanno mostrato un pattern di ricombinazione equivalente con un breakpoint di 170 nt nella seconda metà della S1. Il ceppo cinese XD3 ha presentato un evento di ricombinazione simile ma con un maggiore breakpoint di 435 nt. Questo conferma quanto in precedenza riportato da altri autori (6) sull'elevata frequenza di eventi

ricombinanti nel virus IBV, eventi che possono apparire distribuiti su tutto il genoma virale ma con una maggiore probabilità nelle proteine non strutturali 2, 3, 16 e la proteina S1. Considerata la frequenza con cui compaiono questi eventi, è stato ipotizzato che la ricombinazione sia il principale meccanismo responsabile della diversità genetica e antigenica del virus IBV. La differenziazione in sierotipi dipende dalle variazioni della proteina S1, specialmente se si trovano in epitopi neutralizzanti; per questo motivo, eventi di ricombinazione avvenuti all'interno della proteina S1 potranno determinare con maggiori probabilità la comparsa e successivo adattamento di nuovi genotipi o sierotipi. La continua apparizione di nuove varianti antigeniche può però rendere problematica la realizzazione di adeguate profilassi immunizzanti; questo fa sì che indagini epidemiologiche indirizzate alla caratterizzazione dei ceppi IBV isolati in ogni territorio siano di notevole importanza nella scelta di programmi vaccinali in grado di conferire una buona protezione.

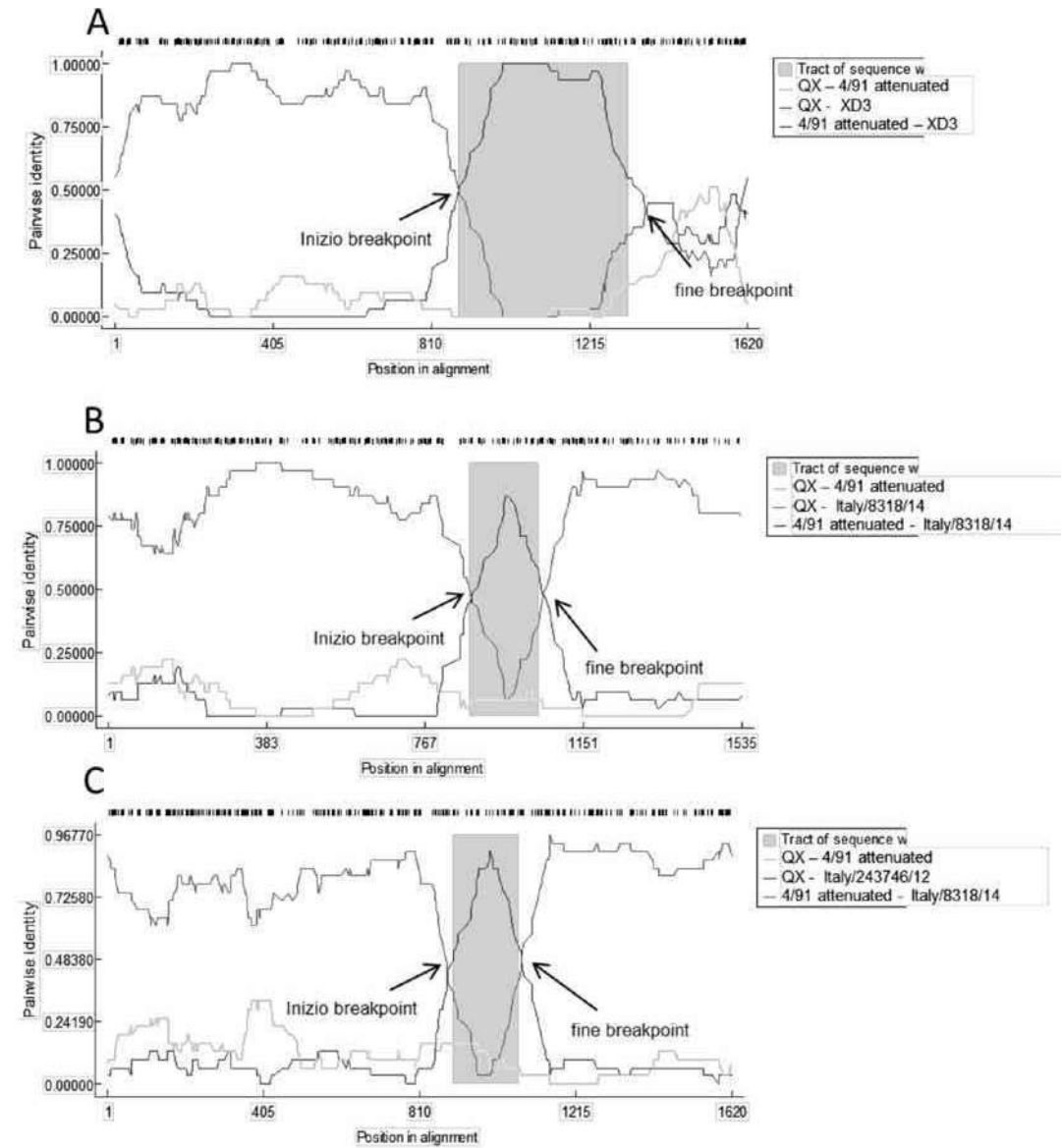
## BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and Naylor CJ.(1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28:593-605.
2. Ji J, Xie J, Chen F, Shu D, Zuo K, Xue C, Qin J, Li H, Bi Y, Ma J and Xie Q. (2011). Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009. *Virology* 421:184
3. Jungherr EL, Chromiak TW and Luginbuhl RE. (1956). Immunological differences in strains of Infectious bronchitis. Proc. 6th Ann. Meet. USLSA, 203-205.
4. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-2463
5. 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. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
6. Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH and Jackwood MW. (2011). Recombination in Avian Gamma-Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Viruses* 3: 1777-1799.

**Figura n.1** - Albero filogenetico Neighbor-Joining ottenuto tramite Bootstrap con 1000 repliche basato sulle sequenze parziali del gene S1. Sono stati riportati solo i valori di bootstrap >70%. I grassetto sono identificati i ceppi analizzati in questo studio.



**Figura n.2** - rappresentazione grafica dell'evento di ricombinazione identificato con tutti i metodi inclusi nell'analisi utilizzando il software DDP3. Per ogni evento la posizione nucleotidica del inizio e fine breakpoint sono riportati. A) evento di ricombinazione identificato nel ceppo XD3, B) nel ceppo Italy/8318/14, C) nel ceppo Italy/243746/12.



## CIRCOLAZIONE DI DIFFERENTI GENOTIPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* NEL SETTORE AVICOLO INDUSTRIALE

Moronato M. L.<sup>1,2</sup>, Baldasso E.<sup>1</sup>, Fincato A.<sup>1</sup>, Qualtieri K.<sup>1</sup>, Flaminio B.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,  
Laboratorio di Medicina aviaria - U.O. Micoplasmici;  
Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Animale,  
Produzioni e Salute (MAPS) Università degli Studi di Padova Agripolis  
Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italia

Corresponding author: scatania@izsvenezie.it

### Summary

*Mycoplasma synoviae* (MS) is an economically important pathogen in poultry industry causing respiratory disease, infectious synovitis and a specific disorder of layers called *Eggshell Apex Abnormalities* (EAA). Several techniques, such as serological, microbiological and molecular methods are available for the diagnosis of MS infection. The analysis of a part of the *vlhA* gene is useful for strain classification. In this study 290 strains of MS collected in backyard and poultry industry were isolated in 2009-2013 and analyzed for nucleotide sequence variability of *vlhA* gene. Basing on our results further investigation are recommended to evidence any possible correlation between genotype, transmission route and clinical signs.

### INTRODUZIONE

*Mycoplasma synoviae* (MS) è attualmente riconosciuto come un importante patogeno del settore avicolo industriale, che nel corso degli ultimi anni ha concentrato su di sé notevole attenzione per un significativo aumento dell'incidenza nel settore avicolo industriale nazionale ed estero.

L'MS può comportare forme respiratorie, forme articolari e infine una sindrome caratteristica della gallina ovaia denominata *Eggshell Apex Abnormalities* -EAA- (Feberwee *et al.*, 2009), tali forme possono aggravarsi nel caso di co-infezione con altri agenti infettivi comportando perdite economiche per scarti in sede di macellazione, aumento dei costi terapeutici, riduzione dell'indice di conversione, ecc.

Attualmente nel controllo delle infezioni da MS si applica la gestione di gruppi di riproduttori MS-free e il rispetto di rigide misure di bio-sicurezza.

La diagnosi di MS è possibile mediante test sierologici (ELISA e SAR), la coltivazione *in vitro* ed esami bio-molecolari. Tra questi ultimi, l'analisi di sequenza di un segmento specifico del gene *vlhA*, che codifica per una lipoproteina di membrana (emoagglutinina) permette la genotipizzazione di differenti ceppi di MS (Bencina *et al.*, 2001).

Sulla base di quanto descritto da Bencina *et al.* (2001) e Hammond *et al.* (2009) si è proceduto alla genotipizzazione dei ceppi di *Mycoplasma synoviae* isolati nel territorio italiano dal 2009 al 2013.

### MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 290 ceppi di MS su un totale di 479 isolati di *Mycoplasma synoviae* provenienti dal settore avicolo industriale nazionale nel periodo 2009-2013.

La selezione dei ceppi è avvenuta secondo i seguenti criteri: anno di isolamento, luogo di provenienza, categoria produttiva, livello di bio-sicurezza (settore riproduzione e settore carne-uova) e analisi bio-molecolare. I ceppi sono stati coltivati mediante procedura interna, con incubazione a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. A crescita avvenuta si è proceduto all'estrazione automatica del DNA (*Maxwell<sup>®</sup>16 Instrument Promega*) e a PCR seguendo le linee descritte da Hammond *et al.* (2009) con alcune modifiche. I prodotti di PCR sono stati verificati su gel 1,5% agarosio e se positivi sono stati inviati al sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state allineate con software MEGA<sup>®</sup> 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) utilizzando come riferimento le sequenze segnalate da Hammond *et al.* (2009).

L'analisi delle sequenze è stata effettuata definendo il "tipo" (A, B, C, D, E, F) dall'analisi del frammento di regione di *vlhA* denominato PRR (*Prolin Rich Repeats*) (Bencina *et al.*, 2001) e il "gruppo" dall'analisi della variabilità della regione MSPB del gene stesso (Hammond *et al.* 2009).

### RISULTATI

Lo studio ha considerato 290 ceppi di MS isolati presso il nostro laboratorio a partire dal 2009.

209 campioni sono riferibili alla specie pollo, 74 alla specie tacchino e i restanti 7 provengono da altre specie avicole minori.

Sulla base del genotipo, è stato possibile riconoscere la presenza di 139 ceppi classificabili come tipo F, 108 tipo D e 28 tipo C. In numero minore sono stati isolati ceppi di MS riferibili ad altri genotipi: H (9), E (2), A (1), G (1). Tra questi sono stati identificati 2 nuovi genotipi, tipo H e tipo G che si aggiungono alla classificazione precedentemente descritta da Bencina *et al.* (2001).

### DISCUSSIONE

Dall'analisi dei dati è possibile evidenziare la presenza di un andamento stagionale degli isolati di *Mycoplasma synoviae*. In particolare, per ciascun anno considerato si possono riconoscere due picchi principali: uno invernale (gennaio) e uno estivo (luglio-agosto).

I ceppi di MS isolati appartengono principalmente a tre genotipi: F, D e C.

Nel 2009 tutti gli isolati del comparto riproduttori sono stati classificati come tipo D, mentre il settore carne si divide in 50% tipo D e 50% tipo F; per i successivi anni (2010-2013) si rinvengono in maniera costante e prevalente i tipi F e D nelle diverse categorie considerate.

Al contrario, i ceppi appartenenti al tipo C esprimono un andamento peculiare: compaiono nel 2010 nel settore carne, nel 2011 e 2012 si evidenziano anche nei riproduttori fino a calare drasticamente in tutte le categorie produttive nel 2013.

Un altro tipo di classificazione proposta da Hammond *et al.* (2009) utilizza l'intera sequenza del gene *vlhA* identificando i "gruppi" e analizzando i nostri dati sulla base del gruppo piuttosto che del tipo si evidenzia una maggiore variabilità tra i ceppi di MS che non permette una facile e rapida valutazione degli stessi.

## CONCLUSIONI

Dall'analisi dei dati ottenuti si evidenzia la maggiore prevalenza di tre genotipi (F, D, C) e di genotipi emergenti. Tale sistema di classificazione applicato ai dati del territorio nazionale, permette di comprendere meglio la distribuzione del patogeno nel settore produttivo. Poche sono ancora le informazioni di tipo anamnestico provenienti dai gruppi avicoli considerati ma sarebbero necessarie ai fini di una eventuale correlazione tra "tipo" e sindrome (respiratoria, articolare, EAA ecc.) al fine di approfondire l'epidemiologia e la patogenesi di *Mycoplasma synoviae* nei diversi settori produttivi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bencina D, Drobnic-Valic M, Horvat S, Narat M, Kleven SH, Dovc P (2001). Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of Mycoplasma synoviae hemagglutinin. FEMS Microbiol Lett. Sep 11;203(1):115-23.
2. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by Mycoplasma synoviae: field and experimental studies. Avian Pathology. 38(1):77-85.
3. Hammond PP, Ramirez AS, Morrow CJ, Bradbury JM (2009). 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. Veterinary Microbiology 136, 61-68.

*Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 "Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole."*

## VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA IN LABORATORIO DI PRODOTTI A BASE DI BICARBONATO DI SODIO E SILICE PER LA LOTTA AL *DERMANYSSUS GALLINAE*

Pampiglione G.<sup>1</sup>, Scaravelli D.<sup>2</sup>, Fiorentini L.<sup>3</sup>, Tosi G.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Consulente Entomologo, Via A Gramsci n. 7, 47016 Predappio  
email [guglielmo.pampiglione@](mailto:guglielmo.pampiglione@)

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,  
via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO)

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e  
dell'Emilia "Bruno Ubertyn", Sezione di Forlì, via Marchini 1, 47122 Forlì

### Summary

A laboratory experiment was provided to evaluate efficacy of a commercial formulate of a product based on silica and sodium bicarbonate against *Dermanyssus gallinae*. The solution at 30% was sprayed in plastic capsules were between 30 and 40 mites were transferred, when product dried, in 3 replicas and in 3 replicas without any treatment. Despite the considerable variability in responses at the day 4 all the treated mites died. The formulation promise good reliability and wide interest as it can be used also in organic farming.

### INTRODUZIONE

*Dermanyssus gallinae* rappresenta il più diffuso ectoparassita nell'industria avicola mondiale. Ha importanza enorme sia come ematofago che indice varie problematiche che possono giungere fino alla morte per anemia e sia per il ruolo di vettore che gli è stato riconosciuto per molti agenti eziologici (Chauve 1998). Si pensa che il 70-80 % degli allevamenti, soprattutto di ovaiole nelle diverse tipologie, ne sia affetto in Italia con ingenti danni stimati (Sparagano et al 2009). Per la sua biologia ed ecologia da sempre è molto difficile controllarlo, con il suo alimentarsi sull'ospite solamente per una mezz'ora e poi portarsi al rifugio anche nei più recondite fessure della struttura e le ripetute velocissime generazioni di cui è capace riuscendo a moltiplicarsi e a muoversi velocemente in tutti i tipi di strutture ove si operino gli allevamenti (Maurer & Baumgärtner, 1994). Il controllo è oggi affidato a una diversificata compagine di acaricidi e spesso il "fai da te" oltre a non avere grandi risultati ingenera anche fenomeni di resistenza e persistenza dei principi attivi nei prodotti destinati all'alimentazione. Nell'ambito delle ricerche in atto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, sezione di Forlì, è stato provato in laboratorio un nuovo prodotto commerciale a base di bicarbonato di sodio e silice per la lotta a questo acaro.

### MATERIALI E METODI

Il prodotto è composto da Silice amorfa precipitata (sintetica) per il 15% e Bicarbonato di sodio 85%, diluito pronto all'uso al 30% in acqua. Nella sperimentazioni è stata utilizzata una popolazione di acari *Dermanyssus gallinae* eterogenea con larve, ninfe e adulti, simile a quanto si riscontra in campo, proveniente da un allevamento di ovaiole della Romagna. Il prodotto è stato utilizzato



tal quale nebulizzandolo con uno spruzzatore a mano su capsule plastiche ermetiche di 4 cm di diametro per 1 cm di altezza. Una volta ben asciutte vi sono stati trasferiti gli acari, in numero variabile ma sempre tra i 30 e i 40 esemplari, mediante un ritaglio di carta precedentemente posizionato nei contenitori di trasporto.

Le capsule sono state collocate in termostato a 30°C e 70% RH. Quotidianamente è stata effettuata il conteggio degli acari vivi e morti. Le piastre sono state osservate allo stereo microscopio a 8-32 ingrandimenti. La sperimentazione ha avuto inizio in data 11/2/2014 per concludersi il 15/2/2014.

## RISULTATI

Le tre repliche hanno mostrato una decisa variabilità nella sopravvivenza nei primi giorni, così come d'altro canto anche le repliche del controllo e nei primi due giorni questa alta variabilità non rende significativo statisticamente il confronto con il non trattato (t di Student). Dal terzo giorno si nota un rapido decremento della sopravvivenza e il quarto si ha la mortalità globale. Le rette di regressione delle medie sui giorni di riscontro hanno valore nel trattato di  $Y = -15,396x + 115,81$  con  $R^2 = 0,9831$  mentre nel controllo si attestano su  $Y = -24,268x + 120,93$  con  $R^2 = 0,9863$ .

## DISCUSSIONE

Il prodotto appare di grande interesse per lo meno in base ai risultati di laboratorio. La sua struttura rende necessaria una attenta preparazione e spargimento ed avendo azione diretta, meccanica e chimica, deve essere asperso adeguatamente in tutte le parti degli impianti dove gli acari possano rifugiarsi, cioè praticamente ogni punto dello stesso. La sperimentazione potrebbe proseguire migliorando il numero di repliche e verificando l'andamento della variabilità, così come potrebbe anche verificare in campo, come speriamo prevedibile, l'efficacia di fronte al variare delle tipologie di allevamento e delle strutture.

## CONCLUSIONI

Il prodotto si presenta di notevole interesse in particolare essendo utilizzabile anche nel settore biologico, dove il controllo dell'Acaro rosso appare per altro decisamente complesso.

Di fronte all'aumentare delle problematiche relative alla specie nell'intero comparto agricolo ogni possibile alternativa nel controllo diviene quindi una opportunità, che deve obbligatoriamente passare da una attenta sperimentazione e dall'approccio integrato, dove il tecnico specializzato divenga in pianta stabile uno degli elementi di guida della produzione, abbandonando facilonerie e improvvisazioni.

## BIBLIOGRAFIA

- Chauve C, 1998. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet Parasitol* 79:239-245.
- Maurer V. and J. Baumgärtner, 1994. A population model for *Dermanyssus gallinae* (Acari, Dermanyssidae). *Exp Appl Acarol* 18:409-422.
- Sparagano O., Pavličević A, Murano T, Camarda A, Sahibi H, Kilpinen O, Mul M, van Emous R, le Bouquin S, Hoel K and MA Cafiero, 2009. Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Exp Appl Acarol* 48(1-2):3-10.

## MYCOPLASMA GALLISEPTICUM NEL SETTORE AVICOLO: STUDIO DEI CEPPI CIRCOLANTI NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Rodio S.<sup>1</sup>, Moronato M. L.<sup>1-2</sup>, Sattin E.<sup>1</sup>, Matucci A.<sup>1</sup>, Gobbo F.<sup>1-2</sup>, Catania S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina aviaria- U.O. Micoplasmi; Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italia

Corresponding author: [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)

## Summary

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) is one of the most important avian pathogen responsible of significant economic losses in poultry industry. MG causes infectious sinusitis in turkeys and it contributes to the chronic respiratory disease in chickens (CRD). It has also been reported in non commercial flocks (partridges, geese, pheasants) and recently became an emerging disease in house finches.

MG diagnosis is mainly based on serology, pathogen cultivation in selective media, and on immunocoloration techniques. Moreover modern PCRs are considered to be more sensitive tool for epidemiological analyses and for the differentiation of circulating MG strains.

In this study 146 MG strains collected in the backyard and poultry industry were isolated in 2010-2013 and analyzed for their nucleotide sequence variability for *Mgc2*, *gapA* and *MG ISR* genes.

## INTRODUZIONE

In ambito aviario le infezioni da *Mycoplasma gallisepticum* (MG) rappresentano per il settore industriale un'importante causa di perdite economiche. L'infezione da MG colpisce prevalentemente l'apparato respiratorio di polli e tacchini, con conseguente forma respiratoria grave; tutti i settori produttivi risultano essere sensibili a tale patogeno. Il controllo di MG si basa principalmente sull'eradicazione dello stesso attraverso la creazione e mantenimento di gruppi MG-free, attraverso anche un corretto ed oculato piano di bio-sicurezza.

MG è caratterizzato da elevata variabilità antigenica, tramite la quale il patogeno riesce a persistere nell'ospite evadendo la risposta immunitaria, quindi l'utilizzo di metodiche bio-molecolari, direttamente sul ceppo batterico isolato, può essere utile ai fini di una sua tipizzazione. L'analisi della sequenza di proteine simili alle adesine, come il gene codificante per una *cythadesin*-Mgc2 è importante ai fini dell'indagine genotipica. Tra queste l'espressione di entrambe *GapA* e *CrmA*, i cui geni mostrano omologia con *Mgc2*, è risultata indispensabile per la cito-aderenza e la patogenicità di MG (Papazisi *et al.*, 2002).

In questo studio 146 isolati di *Mycoplasma gallisepticum* sono stati classificati e analizzati secondo la variabilità nella sequenza del gene *Mgc2*. Inoltre è stata eseguita amplificazione del gene *gapA* in base a quanto descritto da Evans *et al.* (2008). I diversi ceppi di MG sono stati organizzati in un *database* secondo diversi criteri di selezione: anno di isolamento (2010-2013), luogo di provenienza, sintomatologia (se riportata

come dato anamnestico), categoria produttiva, livello di biosicurezza e analisi biomolecolare. Tale indagine ha permesso di valutare le eventuali differenze genotipiche di *Mycoplasma gallisepticum* in isolati recenti provenienti dal territorio italiano.

## MATERIALI E METODI

**Isolamento e identificazione:** sono stati analizzati 146 campioni diagnostici provenienti da singoli focolai di infezione, dei quali 126 di provenienza industriale e 20 di origine rurale. I tamponi prelevati sono stati stemperati in brodi di crescita selettivi per micoplasmi e incubati a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Nello studio sono stati inclusi ceppi vaccinali (6/85 e TS-11) e di riferimento (15302 ATCC e 10115 NTCC), già presenti in laboratorio.

**Estrazione DNA:** in seguito a viraggio di colore della brodo coltura (ad indicare la crescita del patogeno) si procede ad estrazione del DNA mediante metodo automatico (Maxwell016 Instrument Promega).

**Analisi biomolecolare:** si sono sviluppate 3 diverse reazioni di PCR amplificando:

- 1) una regione del gene *Mgc2*, MGA\_0932, codificante per una proteina adesina Mgc2/P32 come descritto da Garcia *et al.* (2005).
- 2) una regione del gene *gapA* come descritto da Evans *et al.* (2008).
- 3) la regione 16S-23S rRNA ISRs *Intergenic Spacer Region sequence* come descritto da Raviv *et al.* (2007).

**Sequenziamento del DNA e analisi:** i prodotti di amplificazione risultati positivi per il gene *Mgc2* e *MG IGSR* sono stati sequenziati e analizzati mediante allineamento con software MEGA<sup>a</sup> 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Alle sequenze ottenute per il gene *Mgc2* è stato associato un colore per ciascun genotipo. Per i ceppi considerati vaccinali (6/85 e TS-11) è stato attribuito rispettivamente il colore *orange* e *pink*; per gli altri ceppi di riferimento: *violet* (10115 NCTC) e *green* (15302 ATCC). Altri genotipi sono stati identificati come *grey*, *light-blue* e *green*, altri colori sono stati assegnati ai ceppi meno rappresentati.

## RISULTATI

Lo studio è stato principalmente focalizzato su campioni di origine industriale o rurale e nel dettaglio: 60 della categoria pollo, 76 tacchino e 10 delle specie minori. Nell'arco dei 3 anni di attività (2010-2013) sono stati raccolti 180 campioni di provenienza italiana, per un totale di 231 sequenziamenti.

In base all'identificazione su sequenza genica *Mgc2* (Garcia *et al.*, 2005) sono stati analizzati 146 isolati con le seguenti prevalenze: *pink* (58), *light-blue* (44), e *grey* (28). Altri genotipi sono stati dimostrati seppur in numero limitato tra i quali l'*orange*, che rappresenta il ceppo di origine vaccinale 6/85, e in ordine decrescente di prevalenza *green*, *fucsia*, *blue*, *black*, *red* e *yellow*.

Parallelamente è stata effettuata una PCR per il gene *gapA* (Evans *et al.*, 2008), positiva ai ceppi di riferimento vaccinali 6/85 e TS-11, inoltre a tale metodica sono risultati positivi tutti i ceppi precedentemente classificati come *orange* e solamente una parte di ceppi appartenenti al tipo *pink*. Infine nessuna positività per la PCR *gapA* è stata riscontrata negli altri colore-tipo.

I positivi alla PCR per il gene *gapA* e catalogati come *orange* sono stati isolati in gruppi classificati come a bassa bio-sicurezza.

Infine nei ceppi riscontrati con maggiore frequenza (*pink*, *light-blue* e *orange*) è stata

eseguita anche l'analisi del gene *ISR* (Raviv *et al.*, 2007) evidenziando un unico gruppo per gli *orange* e gruppi *ISR* differenti per il *pink* e il *light-blue*.

## DISCUSSIONE

Analizzando l'andamento degli isolati di MG nel tempo si osserva che questo patogeno rispecchia la stagionalità tipica del genere *Mycoplasma spp*, con un picco invernale tra dicembre e gennaio ed uno tardo estivo.

Gli aspetti legati a tale correlazione, come le variazioni di temperatura, lo spargimento delle lettiere, l'area geografica di provenienza o altri fattori meriterebbero un approfondimento per meglio chiarire la diffusione ed epidemiologia della micoplasmosi. In generale i campioni provenienti dal settore industriale e rurale mostrano la presenza di tre genotipi principali: *pink*, *light-blue* e *grey*.

Tuttavia l'analisi comparata dei geni *Mgc2* e *ISR* consente di discriminare tra ceppi di origine vaccinale (6/85) e ceppi di campo.

Infine sulla base dei dati raccolti all'interno del settore industriale la possibile associazione tra sindrome clinica e genotipo associato suggerisce che alcuni ceppi appartenenti al genotipo *light-blue* mostrino una sintomatologia clinica piuttosto blanda, inoltre al tipo *pink* si sono associate forme respiratorie conclamate, tuttavia risulta necessaria un'implementazione dei dati anamnestici.

## CONCLUSIONI

La raccolta e l'elaborazione di dati basata su isolati di MG nel corso degli anni ha permesso di evidenziare nuovi aspetti dei ceppi circolanti nel territorio nazionale. L'analisi multipla di diversi geni *Mgc2* - *gapA* - *MGISR* pone l'accento sulla complementarietà tra metodiche per la diagnosi e la migliore comprensione dell'epidemiologia delle micoplasmosi. Risulta utile stabilire una possibile correlazione tra genotipo e dati anamnestici al fine di definire eventuali pato-tipi o ceppi con particolare tessuto tropismo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Evans JD1, Leigh SA. (2008) Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used *Mycoplasma gallisepticum* challenge strains by PCR. *Avian Dis. Sep*; 52(3):491-7.
2. Garcia M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH. (2005) Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis. Mar*; 49(1):125-32.
3. Papazisi L, Frasca S Jr, Gladd M, Liao X, Yogev D, Geary SJ (2002) GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infect Immun. Dec*; 70(12):6839-45.
4. Raviv Z, Callison S, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH. (2007) The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Dis. Jun*; 51(2):555-60.

*Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 "Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole."*

## VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DEL WHITE STRIPING E DI POTENZIALI FATTORI PREDISponentI IN BROILER AL MACELLO

Russo E.<sup>1</sup>, Longoni C.<sup>1</sup>, Pezzotti R.<sup>1</sup>, Fasoli P.<sup>2</sup>, Drigo M.<sup>3</sup>, Recordati C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> MSD Animal Health s.r.l., Via F.lli Cervi snc, Centro Direzionale Milano Due - Palazzo Canova, 20090, Segrate (MI)

<sup>2</sup> Avicola Alimentare Monteverde s.r.l., via San Donato 31, Rovato (BS)

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)

<sup>4</sup> Mouse & Animal Pathology Laboratory, Fondazione Filarete, Viale Ortles 22/4, 20139, Milano

### Summary

White striping (WS) is an alteration of breast and thigh muscles characterized by the presence of white striations parallel to the direction of muscle fibers. This condition is becoming more and more important in meat-type chickens, and occurs mainly in heavier birds (1). The aim of this study was to evaluate prevalence of WS in Italian broilers at slaughter and potential correlated risk factors.

The evaluation of WS was performed in 3 slaughterhouses. We examined 57 broiler flocks, and from each flock, 400 breast were scored (0, normal breast with no striping; 1, moderate presence of white striping; 2 widespread presence of white striping) and anamnestic data were collected.

The overall prevalence of WS was 79% (57% score 1, 22% score 2). The risk factors more correlated with the presence of WS were the average daily gain and the live weight of the broilers. Also incidence of Oregon disease was correlated with the presence of WS. No relationship was found between antibiotic treatments and WS.

This study confirms the importance of WS also in Italian poultry industry and its relationship with the growth rapidity of new genetic hybrids.

### INTRODUZIONE

Il White Striping (WS) è stato descritto per la prima volta nel 2009 (1,2) come un'alterazione della muscolatura del pollo caratterizzata dalla presenza di striature bianche parallele alla direzione delle fibre del muscolo.

Il WS viene classificato a seconda della gravità in tre categorie: muscolo normale (NORM), muscolo che presenta delle striature bianche di spessore inferiore ad 1 mm (MOD), e muscolo che presenta numerose striature di spessore anche superiore ad 1 mm (GRAVE) (2,3). Istologicamente il WS è caratterizzato dalla presenza di lesioni polifasiche riferibili ad una miopatia degenerativa con contemporanea presenza di rigenerazione, fibrosi e infiltrazione di grasso (3).

La presenza di WS non compromette la salubrità delle carni, come invece l'aspetto e le qualità tecnologiche, determinandone un deprezzamento. Da uno studio condotto negli Stati Uniti è emerso che il consumatore percepisce il WS come un difetto che può influire nell'acquisto del petto di pollo fresco (4). Inoltre anche le proprietà nutrizionali della carne di pollo si modificano in presenza di

WS: aumenta il contenuto di grassi e si riduce quello di proteina (5). Le carni che presentano forme gravi di WS presentano alterazioni di pH, maggiori perdite in cottura, e alterazioni di consistenza che le rendono inadatte anche all'utilizzo in preparazioni a base di pollo (6).

La prevalenza di WS riportata in letteratura nei broiler è molto variabile: dal 52% al 76% a 54 giorni (5), in altri studi 12% (6) e 56% (7). La patogenesi del WS è ancora sconosciuta, tuttavia l'incidenza del problema appare legata alla rapidità di crescita e al peso di macellazione (1, 5, 8). Sono state riportate differenze nella prevalenza di WS dovute anche alla dieta (5) e alla genetica (7), tuttavia non è ancora chiaro se questi fattori abbiano un valore in sé, o se le differenze riscontrate siano da attribuirsi all'effetto che questi fattori hanno sulle performance produttive degli animali.

In questo studio si è voluto valutare la prevalenza di WS in alcuni macelli italiani e si è cercato di valutare quali fattori possano essere correlati con l'espressione di questo difetto.

### MATERIALI E METODI

#### Campionamento

Per questo studio sono state valutate complessivamente 57 partite di broiler, medi (19 partite con peso vivo medio 2,6 kg, età media 46 giorni) e pesanti (38 partite con peso vivo medio 3,6 kg, età media 55 giorni) appartenenti a 3 macelli italiani. Al fine di minimizzare eventuali effetti stagionali i rilevamenti sono stati effettuati tutti nel settembre del 2013.

Per ogni partita sono stati valutati 400 petti cui è stato attribuito un punteggio sulla base della classificazione proposta da Kuttappan et al. (3): 0 petto normale, 1 lesione moderata, 2 lesione grave. Per ogni partita si sono poi calcolati un punteggio medio e la percentuale dei due gradi di WS.

Per la valutazione dei fattori di rischio al macello si sono raccolti i seguenti dati anamnestici: peso vivo medio, accrescimento, sesso, colore, linea genetica, età di macellazione, trattamenti antibiotici, percentuale di scarto per malattia di Oregon.

#### Analisi statistica

Le variabili continue (peso vivo medio, accrescimento, età di macellazione, trattamenti antibiotici e percentuale di scarto per malattia di Oregon) sono state correlate sia con il punteggio medio di WS sia con la percentuale di grado 2 di WS. Le analisi di correlazione sono state eseguite determinando l'indice di correlazione di Pearson mediante il software statistico PSPP 0.8.2 della GNU Operating System.

### RISULTATI

La prevalenza totale di WS è stata in media del 78.4±9,7% con un punteggio medio di 1,00±0,21. In tabella 1 sono riportate le prevalenze di WS per i gradi 0, 1 e 2 e il punteggio medio sul campione totale e secondo le classi di peso.

Il punteggio medio di WS e la percentuale di WS di grado 2 sono risultate molto correlate con il peso vivo medio di macellazione (punteggio medio: correlazione di Pearson 0,69, p<0,01; WS grado 2: correlazione di Pearson 0,62, p<0,01), con l'accrescimento (punteggio medio: correlazione di Pearson 0,67, p<0,01; WS grado 2: correlazione di Pearson 0,67, p<0,01). L'età non è risultata correlata né

con il punteggio medio di WS, né con il WS grado 2.

La valutazione dei trattamenti antibiotici, sia come numero di trattamenti che come numero di giorni in trattamento non ha dimostrato alcuna associazione tra trattamenti antibiotici e presenza di WS.

La correlazione tra percentuale di scarto per Oregon e percentuale di WS di grado 2 sul totale delle partite macellate è stata (correlazione di Pearson 0,40,  $p=0,01$ ) valutata all'interno delle partite macellate nello stesso macello è risultata molto elevata (correlazione di Pearson 0,82 -  $p<0,01$  nel primo macello, correlazione di Pearson 0,67 -  $p<0,01$  nel secondo; il terzo macello dati i pochi rilevamenti effettuati non è stato valutabile). La genetica sembra non essere un fattore che, a parità di accrescimento medio giornaliero, influenza l'incidenza di WS, anche se i numeri ridotti non hanno permesso un'analisi statistica completa.

## DISCUSSIONE

I dati di prevalenza riscontrati in Italia sono in accordo con quanto precedentemente riportato negli Stati Uniti da Kuttappan et al. (5,7), mentre risultano notevolmente più alti rispetto a quanto evidenziato da Petracci et al. (6), questo potrebbe essere in parte dovuto alle differenze nei pesi degli animali esaminati nei due studi. Una prevalenza del 78,4% di WS con 21,6% di grado 2 evidenzia come questo difetto sia estremamente diffuso anche nel mercato italiano, soprattutto nelle partite più pesanti. Dato il deprezzamento delle carcasse che presentano questo tipo di difetto, il danno economico che ne deriva per le aziende integrate è notevole.

Dall'analisi statistica emerge che l'insorgenza di WS non è correlata solo al peso vivo medio, come già riportato da Bauermeister et al. (1) e da Kuttappan et al. (5), ma soprattutto all'accrescimento medio giornaliero, parametro notevolmente incrementato in questi anni dal progresso del miglioramento genetico.

La correlazione tra percentuale di malattia di Oregon e di WS di grado 2 è probabilmente da attribuirsi al fatto che le due patologie presentano fattori di rischio simili, oppure ad un collegamento nella patogenesi dei due fenomeni. La differente distribuzione di Oregon che si nota nei due macelli esaminati potrebbe essere dovuta ad un effetto operatore o ad una differenza nella genetica delle partite esaminate.

L'utilizzo di antibiotici era stato preso come parametro per la valutazione dello stato sanitario del gruppo. Nel campione era presente un gruppo di animali provenienti da un'area a bassa densità di popolazione avicola che presentava un numero di trattamenti antibiotici notevolmente inferiore ai gruppi provenienti da aree densamente popolate, probabilmente per la scarsa pressione infettiva ambientale a cui erano sottoposti gli animali. L'assenza di differenze nell'incidenza di WS tra questi due gruppi di allevamenti evidenzia come lo stato sanitario del gruppo non influenzi l'insorgenza di WS.

## CONCLUSIONI

In conclusione questo studio ha evidenziato l'importanza del difetto WS per il mercato italiano. Inoltre ha confermato la correlazione di questo difetto col peso di macellazione anche in condizioni di campo e sottolineato l'importanza dell'elevato accrescimento medio giornaliero nello sviluppo della patologia. Alla luce di questi dati assume una nuova importanza la modulazione della curva

di crescita per il controllo del WS. Ulteriori studi saranno necessari al fine di comprendere come poter intervenire in campo in modo da ridurre l'incidenza del problema senza compromettere la produttività degli animali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bauermeister, L. J., A. U. Morey, E. T. Moran, M. Singh, C. M. Owens, and S. R. McKee. 2009. Occurrence of white striping in chicken breast fillets in relation to broiler size. *Poult. Sci.* 88(Suppl. 1):33. (Abstr.)
2. Kuttappan, V. A., V. B. Brewer, F. D. Clark, S. R. McKee, J. F. Meullenet, J. L. Emmert, and C. M. Owens. 2009. Effect of white striping on the histological and meat quality characteristics of broiler fillets. *Poult. Sci.* 88(E-Suppl. 1):136–137. (Abstr.)
3. Kuttappan, V. A., H. L. Shivaprasad, D. P. Shaw, B. A. Valentine, B. M. Hargis, F. D. Clark, S. R. McKee and C. M. Owens. 2013. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poult. Sci.* 92:331-338.
4. Kuttappan, V. A., Y. Lee, G. F. Erf, J. F. Meullenet, and C. M. Owens. 2012. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poult. Sci.* 91:1240–1247.
5. Kuttappan, V. A., V. B. Brewer, P. W. Waldroup, and C. M. Owens. 2012. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 91:2677–2685.
6. Petracci, M., S. Mudalal, A. Bonfiglio, and C. Cavani. 2013. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poult. Sci.* 92:1670-1675
7. Kuttappan, V. A., V. B. Brewer, A. Mauromoustakos, S. R. McKee, J. L. Emmert, J. F. Meullenet, and C. M. Owens. 2013. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 92:811-819.
8. Kuttappan, V. A., G. R. Huff, W. E. Huff, B. M. Hargis, J. K. Apple, C. Coon, and C. M. Owens. 2013. Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poult. Sci.* 92:339-345.

**Tabella 1:** percentuale di WS di grado 0 (petto normale), 1 (presenza moderata di striature), 2 (presenza grave di striature di spessore anche superiore ad 1 mm) e punteggio medio di WS in partite di broiler pesanti, medi e media complessiva.

Classe di peso	Prevalenza di WS (%)			Punteggio medio
	Grado 0 (normale)	Grado 1 (moderato)	Grado 2 (grave)	
Medi	29,8±7,9	56,9±7,8	13,3±7,1	0,84±0,13
Pesanti	17,5±8,5	57,0±10,3	25,7±12,8	1,09±0,19
Totale	21,6±10,1	56,8±9,4	21,6±12,6	1,00±0,21

## CASI INSOSPETTATI DI PATOLOGIE SCHELETRICHE: DISPLASIA DEL FEMORE IN *THRESKIORNIS AETHIOPICUS* E DI FRATTURA DEL FEMORE IN *ARA MACAO*

Scaravelli D.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>2</sup>, Fiorentini L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,  
via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO)

<sup>2</sup> Istituto zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia  
"Bruno Ubertain", via Marchini 1, 47122 Forlì

### Summary

In an adult male of *Threskiornis aethiopicus* was found a displasia of the femur with diffuse periartritic areas and new-formations and in adult female *Ara macao* the fracture of the femur. Despite the gravity of the fracture both the two case go under silence in the two collections of derivation of the specimens. A strong attention and training have to be paid to the welfare of animals.

### INTRODUZIONE

La presenza di fratture o altri danneggiamenti osteo-articolari, oltre ad essere una problematica ben conosciuta negli allevamenti, risulta anche documentata in ambito selvatico (ad es. Hart 1988).

Una delle particolarità che il gestore si trova di fronte occupandosi di specie selvatiche sia in zoo che in ambito naturale è la difficoltà di rilevare sintomatologie correlate a tutti gli stati patologici in quanto controsezionati dall'evoluzione, persino quando interessino fratture e lesioni gravi (Hart, 1988).

Diviene quindi difficile in molte situazioni, senza una specifica preparazione ed attenzione, rilevare stati patologici e si riportano due casi esemplificativi relativi.

### MATERIALI E METODI

Due esemplari, un maschio adulto di *Threskiornis aethiopicus* e uno di femmina adulta di *Ara macao* morti di recente il primo in una collezione zoologica marchigiana e la seconda da una collezione siciliana per rilievi patologici e biologici all'Istituto zooprofilattico Sperimentale per la Lombardia e l'Emilia, sezione di Forlì.

Entrambi gli esemplari apparivano morti di setticemia da agenti eziologici diversi derivanti nel primo da ingestione di alimenti non propri sottratti ad altri animali e nel secondo per invasione da parte di batteri opportunisti a partire da una apparente ferita ad una gamba.

Oltre alle tecniche standard di indagini, per ragioni museali l'intero scheletro è stato preparato e evidenza di danni osteologici rilevati. Un'indagine quindi retrospettiva è stata effettuata presso i keeper nelle collezioni per verificare comportamenti e sintomatologie rilevate.

### RISULTATI

Il primo caso ha visto il riscontro nel *T. aethiopicus* di una evidente displasia del femore sinistro con una diffusa osteoartrite che ha interessato il bacino e la testa del femore con deformazioni di entrambi a guisa di una forma articolare non funzionale. Questa situazione non risulta mai rilevata nella specie in esame, né in cattività, come in questo

caso, né in natura. Non è stato possibile capire quale la genesi di questa situazione, in quanto non rilevata dai keeper che hanno ritrovato appunto l'esemplare morto per altra infezione. Lo stato periartroico denota un lungo periodo, sicuramente di mesi, per la strutturazione delle rilevate deformazioni.

Il secondo caso ha visto il ritrovamento di una frattura del femore destro nella femmina di *Ara macao* con distacco delle due parti. La frattura mostra un evidente callo periostale che interessa entrambi i lembi del femore distaccati e che andava a recuperare anche la scheggiatura avvenuta in situ del tratto prossimale dello stesso.

Recuperando la storia dell'esemplare risultava un attacco da parte del maschio della coppia nella preparazione del periodo riproduttivo, con ripetuti colpi di becco oltre ad altri comportamenti aggressivi. Il becco degli psittaciformi ha una struttura particolare e la sutura craniofaciale è in grado di potenziare, grazie al gioco di leve, la forza disponibile creando un potente strumento atto a rompere gusci particolarmente duri per potersi cibare dei semi. La stessa struttura ovviamente diviene molto pericolosa quando il becco venga usato consciamente come arma di offesa.

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante oltre all'indagine semiologica tipica nei confronti delle patologie osteoarticolari si siano affiancate nuove ed efficaci tecniche (Redig 1986; Harcourt-Brown, 2005; Gumpenberger & Scope, 2012) vi è la possibilità che queste comunque passino inosservati in sistemi dove l'individuo sia meno facilmente osservabile.

Nel primo caso il maschio di *T. aethiopicus* era parso zoppiare leggermente ma non in modo significativo ed alimentarsi e comportarsi in modo normale nella collezione, un ampio recinto con altre specie. Nel secondo, dopo l'attacco da parte del maschio, la femmina era stata tenuta a riposo solitaria e aveva mostrato stato prostrato ma non particolarmente negativo, se non un mese dopo velocemente peggiorare e morire per l'infezione sopra riportata.

In termini generali molta parte delle fratture può essere riparata con tecniche classiche o moderne (ad es. Redig 1986) ma necessita nelle collezioni di una precisa attenzione per l'individuazione dei comportamenti a rischio e di un training specifico per i keeper per l'individuazione dei sintomi e una gestione preventiva delle interazioni che sia basta su una adeguata conoscenza dei comportamenti dell'avifauna considerata.

### BIBLIOGRAFIA

1. Gumpenberger M. and A. Scope (2012) Computed tomography of coxofemoral injury in five mute swans (*Cygnus olor*), *Avian Pathology*. 41, (5): 465-468.
2. Harcourt-Brown, N.H. (2005). Orthopaedic and beak surgery. In N.H. Harcourt-Brown & J. Chitty (Eds.). *Psittacine Birds*, 2nd edn., Ames, IA: BSAVA, Iowa State University Press (pp. 120-135).
3. Hart, B.L., (1988). Biological Basis of the Behavior of Sick Animals *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 12: 123-137.
4. Redig P. (1986). Clinical Review of Orthopaedic Techniques Used in the Rehabilitation of Raptors. In: Fowler ME (ed). *Zoo and Wild Animal Medicine*, 2nd Edn. Pub: Saunders. 1986, p 388 – 401.
5. Rothschild B.M. and R. Panza, (2005). Osteoarthritis is for the birds. *Clin Rheumatol.*, 25: 645–647
6. Tiemeier O.W., (1941). Repaired Bone Injuries in Birds. *The Auk* 58(3): 350-359.
7. Wood H.B., (1941). Fractures among Birds. *Bird-Banding*, 12 (2): 68-72.

## ANDAMENTO DELLA CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO (DON) E DA TOSSINA T-2 IN MANGIMI DESTINATO A SPECIE AVICOLE E DESCRIZIONE DI CASI CLINICI CORRELATI NEL POLLO DA CARNE

Tosi G.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Ceroni S.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Compagnoni E.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sezione Diagnostica di Forlì - Via Marchini 1 - Forlì (FC) - [forli@izsler.it](mailto:forli@izsler.it)

<sup>2</sup> Medico Veterinario Aziendale - Settore Avicolo - Via Linguerra 21, Imola (BO).

<sup>3</sup> Laurea in Scienze farmaceutiche Applicate - Curriculum Tossicologia dell'Ambiente - Via Silvestro Lega 46, Modigliana (FC).

### Summary

A 2-year survey was carried out in order to evaluate the incidence of mycotoxins in poultry feed. *Fusarium* mycotoxins tested were those known for their impact on feed industry and poultry husbandry, namely deoxynivalenol (DON) and T-2 toxin. A total of 235 feed samples were analyzed. The data obtained showed an increase in the levels of DON and T-2 toxin in 2013 and, in particular, in the summer-autumn period. In the same period some outbreaks linked to a trichotecen mycotoxicosis were observed in broiler chicken flocks. The toxic effects (clinical signs and lesions) of trichotecen observed in these cases are described.

### INTRODUZIONE

Le micotossine rappresentano un serio pericolo per tutto il settore zootecnico. In campo avicolo i rischi più frequenti sono rappresentati dalla contaminazione da tricoteceni. Si tratta di un gruppo di micotossine comprendente circa 100 molecole prodotte prevalentemente da muffe appartenenti al genere *Fusarium* spp. Chimicamente i tricoteceni si dividono in macrociclici e non macrociclici. Le micotossine più importanti dal punto di vista tossicologico appartengono a quest'ultimo gruppo e si dividono, a loro volta, in non-macrocicliche di tipo A (comprendenti, tra le altre, la tossina T-2, la tossina H-T2 e il diacetossiscirpenolo o DAS) e in non macrocicliche di tipo B (tra cui il deossinivalenolo o DON e il nivalenolo). A livello cellulare i tricoteceni agiscono primariamente attraverso l'inibizione della sintesi proteica e, successivamente, inibendo la sintesi degli acidi nucleici. La loro azione tossica si manifesta pertanto sulle cellule in fase di attiva moltiplicazione (muose dell'apparato gastroenterico, cute, cellule linfoidi ed eritrociti). La principale risposta fisiologica all'intossicazione da tricoteceni è la minor assunzione di alimento. Da questo punto di vista il suino è più sensibile al DON, mentre le specie aviari sono più sensibili alla tossina T-2 e al DAS. I tricoteceni sono inoltre dotati di spiccata attività immunodepressiva, seconda soltanto alle aflatossine. Nella pratica clinica i casi di intossicazione da tricoteceni si rilevano con maggiore frequenza nell'allevamento della gallina ovaioia da consumo, probabilmente a causa degli elevati livelli di mais contenuti nella razione e della lunga durata del ciclo produttivo (e quindi dell'assunzione di alimento contaminato). Tuttavia, nel corso del 2013, sono stati osservati ripe-

tuti casi di intossicazione da tricoteceni anche nel pollo da carne. La descrizione di questi casi e i risultati delle prove di laboratorio condotte è il primo obiettivo di questo lavoro. Vengono inoltre illustrati e discussi i dati relativi ai livelli di contaminazione da tossina T-2 e da DON in mangimi destinati alle specie avicole esaminati, presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì, nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014.

### MATERIALI E METODI

**Casi clinici:** i casi osservati si riferiscono al periodo Luglio-Agosto 2013. L'iter diagnostico prevedeva le seguenti fasi: esame clinico in allevamento, raccolta dei dati zootecnici, esame anatomo-patologico di soggetti con segni clinici, prove di laboratorio (parassitologiche, batteriologiche e virologiche mediante prove di biologia molecolare) ad ampio spettro per la conferma/esclusione di agenti infettivi, prove isto-patologiche condotte su sezioni di organo sede di lesioni macroscopiche sospette. Venivano inoltre esaminati (vedi paragrafo seguente) campioni di mangime prelevati in allevamento o in corrispondenza dello scarico dello stesso in azienda.

**Ricerca di tossina T-2 e DON nei mangimi:** sono stati raccolti i dati relativi alla ricerca di tossina T-2 e di DON in campioni di mangime conferiti presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014. Sono stati considerati campionamenti di mangime completo prelevati direttamente in allevamento dal veterinario aziendale o dall'allevatore a seguito di un sospetto di micotossicosi oppure nell'ambito di periodici controlli aziendali. Sono stati inclusi nello studio i campioni provenienti dalle seguenti tipologie produttive: pollo da carne, gallina ovaioia da consumo (senza distinzione tra fase di accrescimento e fase di deposizione) e pollo riproduttore (senza distinzione tra linee leggere e pesanti e tra fase di accrescimento e fase di deposizione). I campioni sono stati raccolti direttamente in mangiatoia oppure al momento dello scarico del mangime in azienda. Non è stato adottato alcun protocollo standard di campionamento.

La ricerca di tossina T-2 e di DON è stata eseguita mediante l'impiego di test ELISA (TECNA®) che, in sintesi, prevedono le seguenti fasi: preparazione del campione (macinazione, miscelazione, estrazione in acqua/metanolo, filtrazione), esecuzione del test immunoenzimatico su micropiastra, lettura dei valori di assorbanza, calcolo della concentrazione della micotossina mediante l'impiego di curve di calibrazione. I limiti di rilevazione sono di 50 ppb (per il DON) e di 25 ppb (per la tossina T-2). I risultati sono stati raggruppati in categorie in funzione del livello di contaminazione.

### RISULTATI

**Ricerca di tossina T-2 e DON nei mangimi:** Sono stati presi in esame 51 campioni esaminati nel 2012 (9 da polli da carne, 27 da galline ovaiole e 15 da riproduttori), 155 campioni del 2013 (58 da polli da carne, 66 da galline ovaiole, 31 da riproduttori) e 29 campioni esaminati nei primi due mesi del 2014 (3 da polli da carne e 26 da galline ovaiole). I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle 1 e 2:

**Tabella 1:** prevalenza della contaminazione da DON nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014.

	<b>2012 (n=51)</b>	<b>2013 (n=155)</b>	<b>2014 (n=29)</b>
0-50 ppb	43%	20%	17%
51-250 ppb	47%	31%	48%
251-500 ppb	10%	26%	25%
501-1000 ppb	0%	16%	10%
>1000 ppb	0%	7%	0%

n= numero di campioni esaminati

**Tabella 2:** prevalenza della contaminazione da tossina T-2 nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014.

	<b>2012 (n=51)</b>	<b>2013 (n=155)</b>	<b>2014 (n=29)</b>
0-25 ppb	88%	48%	34%
26-50 ppb	12%	34%	48%
51-100 ppb	0%	16%	18%
>100	0%	2%	0%

n= numero di campioni esaminati

Dai dati raccolti emerge un significativo aumento dei livelli di contaminazione di entrambe le micotossine nel corso del 2013 associato ad un sensibile incremento del numero dei campioni esaminati (e, di conseguenza, dei casi sospetti). Tale incremento veniva rilevato soprattutto a partire dal terzo trimestre dell'anno e si manteneva, sia pure in maniera meno evidente, fino alla fine del 2013 e all'inizio del 2014. Questo andamento si osservava soprattutto nei mangimi prelevati da gruppi di polli da carne e di galline ovaiole da consumo (tabelle 3 e 4):

**Tabella 3:** prevalenza della contaminazione da DON nel 2013 in funzione del tipo di allevamento.

	<b>Polli da carne</b>	<b>Galline ovaiole</b>	<b>Riproduttori</b>
0-50 ppb	8%	29%	28%
51-250 ppb	25%	31%	48%
251-500 ppb	30%	21%	24%
501-1000 ppb	23%	17%	0%
>1000 ppb	14%	2%	0%

**Tabella 4:** prevalenza della contaminazione da tossina T-2 nel 2013 in funzione del tipo di allevamento.

	<b>Polli da carne</b>	<b>Galline ovaiole</b>	<b>Riproduttori</b>
0-25 ppb	36%	47%	71%
26-50 ppb	43%	35%	16%
51-100 ppb	16%	18%	13%
>100 ppb	5%	0%	0%

**Casi clinici nel pollo da carne:** a partire dai mesi di luglio-agosto 2013 venivano osservati diversi casi clinici da sospetta intossicazione da tricoteceni in gruppi di polli da carne. Dal punto di vista clinico/zootecnico i gruppi colpiti presentavano anoressia/disoressia, difformità di sviluppo, riduzione degli indici di crescita, scarso sviluppo del piumaggio, deficit di pigmentazione di cute e tarsi. I soggetti colpiti in modo più grave presentavano inoltre una profonda depressione del sensorio associata a difficoltà posturali e tremori. Si osservava un incremento degli indici di mortalità collegabili solo in parte a complicazioni batteriche secondarie (clostridiosi, colisetticemia). Il quadro clinico cominciava e rendersi evidente attorno ai 20 giorni di vita e si manteneva pressoché costante per tutta la durata del ciclo produttivo. All'esame anatomico-patologico si rilevavano le seguenti lesioni macroscopiche: necrosi e ulcere nella cavità orale (in particolare nella regione del palato), contenuto gastroenterico scarso o del tutto assente con erosioni e ulcere a carico della membrana (e della mucosa sottostante) dello stomaco muscolare associate talvolta alla presenza di melena; ipoplasia degli organi linfoidi (timo, borsa di Fabrizio, milza), lesioni infiammatorie-congestive a carico di tutta la mucosa del duodeno e dell'ileo, intensa congestione del pancreas, aree di necrosi epatiche. All'esame istopatologico si evidenziavano le seguenti lesioni: estese necrosi coagulative al fegato con focolai di infiltrazione linfoide sub-endoteliale, necrosi multifocali a carico della polpa bianca splenica, gastrite eterofila, necrosi dei follicoli linfatici intestinali. Le prove di laboratorio escludevano il coinvolgimento di agenti infettivi di natura batterica o virale. Nelle fasi successive del ciclo produttivo venivano diagnosticati casi di enterite necrotica e di colisetticemia. I livelli di DON rilevati nel mangime al momento della comparsa del quadro clinico erano compresi tra 590 ppb e 3240 ppb, mentre i livelli di tossina T-2 oscillavano tra 36 e 158 ppb. I principali dati produttivi (confrontati con quelli del ciclo precedente) di tre casi tra quelli osservati sono riassunti nella tabella 5:

**Tabella 5:** principali dati produttivi di tre gruppi “problema” confrontati con le performance del ciclo precedente.

	Gruppo “A”		Gruppo “B”		Gruppo “C”	
	Ciclo normale	Ciclo “micotossine”	Ciclo normale	Ciclo “micotossine”	Ciclo normale	Ciclo “micotossine”
Mortalità	2,96%	11,65%	3,95%	5,68%	2,32%	4,69%
Kg /m <sup>2</sup>	43,92	38,26	43,61	42,08	48,86	39,91
Indice di conversione	1,75	1,87	1,73	1,91	1,69	1,87
Indice di performance	308,4	260,4	334,2	253,9	346,7	271,2

## DISCUSSIONE

Il quadro clinico e le lesioni osservate nei casi riportati in questo lavoro sono compatibili con un’intossicazione da tricoteceni. Prove sperimentali pubblicate in letteratura hanno dimostrato come livelli di 4 ppm di tossina T-2 somministrati per 3 settimane in pulcini di 1 giorno provocano riduzioni significative degli indici di crescita, segni clinici di tipo neurologico, lesioni necrotiche al fegato e agli organi linfoidi, alterazioni del piumaggio. Le lesioni necrotico-ulcerative al cavo orale sono state riprodotte sperimentalmente impiegando diversi dosaggi/tempi di esposizione di tossina T-2 (4 ppm per 1 settimana, 400 ppb per 7 settimane, 100 ppb per 5 settimane). Il rifiuto dell’alimento è stato invece riprodotto sperimentalmente con dosi di tossina T-2 di 0,3 ppm (nell’acqua di bevanda) e di 5 ppm nell’alimento. Sempre secondo i dati sperimentali pubblicati in letteratura, l’azione tossica del DON nelle specie aviari si manifesterebbe soprattutto sulla funzionalità dell’apparato digerente (attraverso la riduzione della lunghezza e dello spessore dei villi intestinali) e sul sistema immunitario. Anche in questo caso i livelli di DON grazie ai quali sono stati riprodotti sperimentalmente i suoi effetti tossici (ad esempio 16 ppm per 3 settimane) sono superiori a quelli rilevati nei casi descritti in questo lavoro. Va tuttavia ricordato che, nella maggior parte dei casi, le prove sperimentali utilizzano diete artificialmente contaminate da singole micotossine purificate, una situazione ben diversa da quelle di campo in cui è frequente la contemporanea presenza di più micotossine che possono interagire tra loro con effetti additivi o addirittura sinergici.

Il significativo rialzo dei livelli di tossina T-2 e di DON rilevato nel 2013 (soprattutto nei mesi estivi) è probabilmente collegato all’impiego di lotti di materie prime contaminate. Non è stato possibile, tuttavia, approfondire le ricerche su queste ultime né conoscerne la provenienza. I tricoteceni possono contaminare la maggior parte dei cereali e molto dipende dalle condizioni climatiche in cui questi ultimi vengono coltivati e raccolti. W

## CONCLUSIONI

Se l’approccio al problema “micotossine” è prettamente di tipo sanitario, gli strumenti diagnostici disponibili (osservazione dei segni clinici e delle lesioni, valutazione dei dati produttivi, esclusione di altre patologie) possono essere sufficienti a formulare una diagnosi corretta. Il regolare controllo dei livelli di micotossine nelle materie prime e nei mangimi può essere utile a confermare il sospetto diagnostico e, più in generale, a evidenziare tempestivamente pericolosi scostamenti dai livelli abituali di contaminazione. In questo tipo di approccio possono assumere una valenza significativa anche livelli di contaminazione distanti da quelli riportati dalle prove sperimentali pubblicate in letteratura e dai (peraltro scarsi) limiti di legge. Tutto questo viene invece vanificato se l’approccio al problema è esclusivamente di tipo commerciale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Awad W.A., Ghareeb K., Bohm J. (2012). The toxicity of Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in poultry feeding. *World’s Poultry Science Journal* 68:651-667.
2. Chi M.S., Mirocha C.J., Kurtz H.J., Weaver G., Bates F., Shimoda W. (1977). Subacute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Science* 56:306-313.
3. Girgis G.N., Smith T.K. (2010). Comparative aspects of Fusarium mycotoxins in poultry fed diets containing naturally contaminated grains. *World’s Poultry Science Journal* 66:65-86.
4. Kubena L.F., Huff W.E., Harvey R.B., Phillips T.D., Rottinghaus G.E. (1989). Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in boiler chicks. *Poultry Science* 68:622-626.
5. Sklan D., Klipper E., Friedman A., Shelly M., Makovsky B. (2001). The effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol, T-2 toxin and aflatoxin on performance, health and antibody production in chicks. *Journal of Applied Poultry Research* 10:79-85.
6. Wyatt R.D., Colwell W.M., Hamilton P.B., Burmeister H.R. (1973). Neural disturbances in chickens caused by dietary T-2 toxin. *Applied Microbiology* 26:757-761.
7. Wyatt R.D., Hamilton P.B., Burmeister H.R. (1973). The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science* 52:1853-1859.



## ANDAMENTO DELLA SENSIBILITA' ANTIBIOTICA NEI CONFRONTI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE ALLEVATE E DA AVIFAUNA SELVATICA

Tosi G. <sup>1</sup>, Fiorentini L. <sup>1</sup>, Casadio M. <sup>1</sup>, Massi P. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Sezione Diagnostica di Forlì – Via Marchini 1 – Forlì (FC) – [forli@izsler.it](mailto:forli@izsler.it)

### Summary

In the first part of the study a collection of the data on the *in vitro* sensitivity tests (antibiograms) performed on pathogenic *E.coli* strains isolated from poultry farms was carried out. During the considered period (from January 2012 to March 2014) there were no significant differences in the susceptibility of the tested strains. A high prevalence of the susceptibility towards ampicillin and colistin was observed. The susceptibility range towards enrofloxacin was between 73% and 79% but an increase of the resistant strains was observed especially in *E.coli* strains isolated from broiler chicken and meat turkey flocks. In the second part of this study we examined the antibiotic resistance profile of *E.coli* strains recovered from the gut of wild birds collected in Emilia Romagna region in 2013. Resistance in *E.coli* isolates was detected on 15 of the 18 tested antibiotics including some antibiotics effective against Gram-negative bacteria.

### INTRODUZIONE

Il largo impiego di antibiotici e, più in generale, di antimicrobici in medicina umana e veterinaria ha comportato una graduale diffusione di ceppi batterici resistenti. La resistenza agli antibiotici è perciò diventato un problema prioritario che coinvolge sanità animale, salute pubblica e sicurezza alimentare. *Escherichia coli* è una delle specie batteriche maggiormente coinvolte in questo fenomeno ed è allo stesso tempo il più diffuso tra i microrganismi patogeni nelle specie avicole allevate. In campo zootecnico numerosi paesi europei hanno adottato (o stanno per adottare) programmi di graduale riduzione dell'uso di antibiotici. Per raggiungere questo obiettivo è necessario implementare le misure di biosicurezza e, laddove possibile, di profilassi immunizzante nonché il ricorso a prodotti alternativi. E' inoltre importante che la terapia antibiotica venga eseguita in modo mirato e sia la tappa finale di un percorso diagnostico che preveda un sospetto clinico e anatomo-patologico, una diagnosi eziologica di conferma e l'esecuzione di prove *in vitro* (antibiogramma, calcolo delle MIC) per valutare la sensibilità del ceppo batterico isolato nei confronti delle principali molecole disponibili sul mercato. Un altro aspetto di primaria importanza è lo studio del fenomeno dell'antibiotico-resistenza nella fauna selvatica. La selezione di ceppi batterici resistenti agli antibiotici nella microflora intestinale della fauna selvatica può determinare la diffusione dei relativi geni codificanti per questo fenomeno in un habitat con il quale possono interagire numerose attività umane e zootecniche. Inoltre le specie selvatiche possono essere considerate degli importanti indicatori di antibiotico-resistenza dal momento che non ricevono trattamenti antibiotici. Lo scopo del presente lavoro è pertanto duplice:

- 1) Raccogliere dati riguardanti l'andamento delle sensibilità antibiotica *in vitro* dei ceppi di *Escherichia coli* isolati dal 2012 ad oggi nel pollo e nel tacchino.
- 2) Determinare il profilo di sensibilità agli antibiotici di ceppi commensali di *Escherichia coli* isolati da diverse specie di volatili selvatici nel corso del 2013.

### MATERIALI E METODI

**Ceppi batterici:** per la parte riguardante il settore zootecnico sono stati presi in considerazione gli antibiogrammi eseguiti su ceppi di *Escherichia coli* isolati e identificati presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì negli anni 2012, 2013 e nei primi due mesi del 2014. I ceppi sono stati isolati da casi clinici di infezione da *E.coli* con diffusione sistemica del microrganismo. E' stata considerata la casistica riguardante l'allevamento del pollo da carne, della gallina ovaioia da consumo (differenziando la fase di accrescimento da quella di deposizione), del pollo riproduttore (senza differenziare tra linea leggera e pesante e tra periodo di pollastra e di deposizione) e del tacchino da carne. E' stata inoltre considerata una ulteriore categoria comprendente i ceppi isolati dalla specie pollo (senza distinzione tra linea leggera che pesante) nei primi giorni di vita (sia da campioni provenienti dagli incubatoi che dagli allevamenti).

Per la seconda parte dello studio (riguardante l'avifauna selvatica) sono stati considerati ceppi di *E.coli* isolati dal contenuto intestinale di carcasse appartenenti a specie selvatiche raccolte sul territorio da enti preposti e conferite presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì nel 2013 per l'accertamento della causa di morte. Nessuno tra i soggetti esaminati presentava lesioni anatomo-patologiche riferibili a forme di colibacillosi (enteriche o sistemiche); si tratta pertanto di ceppi definibili come "commensali". Oltre ai ceppi di *E.coli* isolati da avifauna selvatica è stata inoltre determinata, con il medesimo sistema, la MIC nei confronti di alcuni ceppi isolati nel 2013 da casi di colibacillosi in allevamenti industriali di pollo, tacchino, anatra e quaglia.

**Prove di sensibilità *in vitro*:** nella prima parte dello studio (riguardante il comparto zootecnico) i ceppi di *E.coli*, una volta isolati e identificati (su base morfologica e biochimica) sono stati sottoposti ad un antibiogramma eseguito secondo il metodo Kirby-Bauer che prevede, sinteticamente, le fasi seguenti: allestimento di una brodocoltura a concentrazione nota (0.5 della scala McFarland) del microrganismo in esame, semina sulla superficie di un terreno di coltura (Mueller Hinton Agar – produzione IZSLER), applicazione sulla superficie del terreno di dischetti imbevuti di antibiotico/chemioterapico (OXOID®) a concentrazione nota, incubazione (37 ± 2°C per 18-24 ore in aerobiosi), lettura del diametro dell'area di inibizione circostante ciascun dischetto. Confrontando le dimensioni del diametro di inibizione con tabelle di riferimento fornite dalla casa produttrice dei dischetti, ciascun ceppo batterico è stato classificato come "resistente (R)", "intermedio (I)" e "sensibile (S)". Nello studio sono stati considerati solo i principali antibiotici/chemioterapici impiegati nella terapia delle infezioni da *E.coli* in campo avicolo: ampicillina, amoxicillina, colisitina, enrofloxacin, flumequina, l'associazione lincomicina+spectinomicina e l'associazione trimetoprim+sulfametossazolo.

Nella seconda parte dello studio (riguardante l'avifauna selvatica) i ceppi di *E.coli*, una volta isolati e identificati (su base morfologica e biochimica), sono stati

sottoposti ad una prova *in vitro* per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC). Per la prova è stato impiegato un sistema standardizzato (AVI-PRO PLATE®) costituito da pannelli (piastre microtiter a 96 pozzetti) contenenti 1µg di diversi antibiotici impiegati in campo umano e veterinario e progettato per determinare la minima concentrazione inibente nei confronti di batteri Gram positivi e Gram negativi. Per la definizione dei criteri di sensibilità (“breakpoints”) venivano considerati i criteri definiti dall’azienda produttrice del test. Per ciascuno dei ceppi esaminati veniva allestita una brodocoltura a concentrazione nota (0.5 della scala McFarland). La MIC veniva definita come la più bassa concentrazione del principio attivo in grado di inibire lo sviluppo del ceppo batterico

## RISULTATI

I risultati della prima parte dello studio, suddivisi per principio attivo, anno e categoria produttiva, sono riassunti nelle successive tabella 1,2,3,4,5,6,e 7:

**Tabella 1:** sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti del principio attivo AMINOSIDINA.

	2012 (n=384)			2013 (n=593)			2014 (n=119)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
POLLO DA CARNE	53	0	13	80	1	11	24	0	2
GALLINA OVAIOLA	110	3	10	158	2	15	28	0	0
POLLA STRA	18	0	4	31	2	5	7	0	0
PULCINO	106	0	19	120	4	22	36	0	2
RIPRODUTTORE	25	1	2	49	3	3	5	0	1
TACCHINO	18	0	2	74	0	13	12	0	2
<b>TOTALE n.</b>	<b>330</b>	<b>4</b>	<b>50</b>	<b>512</b>	<b>12</b>	<b>69</b>	<b>112</b>	<b>0</b>	<b>7</b>
<b>TOTALE %</b>	<b>(86%)</b>	<b>(1%)</b>	<b>(13%)</b>	<b>(86%)</b>	<b>(2%)</b>	<b>(12%)</b>	<b>(94%)</b>	<b>(-)</b>	<b>(6%)</b>

**Tabella 2:** sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti del principio attivo AMOXICILLINA.

	2012 (n=417)			2013 (n=593)			2014 (n=119)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
POLLO DA CARNE	8	2	56	10	0	82	3	0	23
GALLINA OVAIOLA	33	6	85	65	2	112	17	0	12
POLLA STRA	8	1	13	6	2	24	2	0	5
PULCINO	22	4	70	31	2	115	12	0	25
RIPRODUTTORE	14	4	38	25	1	29	5	0	1
TACCHINO	7	3	43	13	3	71	3	0	11
<b>TOTALE n.</b>	<b>92</b>	<b>20</b>	<b>305</b>	<b>150</b>	<b>10</b>	<b>433</b>	<b>42</b>	<b>0</b>	<b>77</b>
<b>TOTALE %</b>	<b>(22%)</b>	<b>(5%)</b>	<b>(73%)</b>	<b>(25%)</b>	<b>(2%)</b>	<b>(73%)</b>	<b>(35%)</b>	<b>(-)</b>	<b>(65%)</b>

**Tabella 3:** sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti del principio attivo COLISTINA.

	2012 (n=417)			2013 (n=593)			2014 (n=119)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
POLLO DA CARNE	58	0	7	86	4	1	26	0	0
GALLINA OVAIOLA	112	7	5	171	4	2	28	0	0
POLLA STRA	17	1	1	30	0	2	7	0	0
PULCINO	116	1	7	151	5	5	39	0	0
RIPRODUTTORE	31	0	1	43	2	0	5	0	0
TACCHINO	43	3	7	77	5	5	14	0	0
<b>TOTALE n.</b>	<b>377</b>	<b>12</b>	<b>28</b>	<b>558</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>119</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOTALE %</b>	<b>(90%)</b>	<b>(3%)</b>	<b>(7%)</b>	<b>(94%)</b>	<b>(3%)</b>	<b>(3%)</b>	<b>(100%)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>

**Tabella 4:** sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti del principio attivo ENROFLOXACINA.

	2012 (n=418)			2013 (n=593)			2014 (n=119)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
POLLO DA CARNE	35	2	33	53	7	33	23	1	9
GALLINA OVAIOLA	99	2	28	169	3	27	30	0	2
POLLA STRA	13	0	7	27	1	3	5	0	0
PULCINO	97	1	18	89	5	27	20	0	4
RIPRODUTTORE	26	0	4	53	2	7	10	1	0
TACCHINO	35	2	16	54	2	31	6	0	8
<b>TOTALE n.</b>	<b>305</b>	<b>7</b>	<b>106</b>	<b>445</b>	<b>20</b>	<b>128</b>	<b>94</b>	<b>2</b>	<b>23</b>
<b>TOTALE %</b>	<b>(73%)</b>	<b>(2%)</b>	<b>(25%)</b>	<b>(75%)</b>	<b>(3%)</b>	<b>(22%)</b>	<b>(79%)</b>	<b>(2%)</b>	<b>(19%)</b>

**Tabella 5:** sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti del principio attivo FLUMEQUINA.

	2012 (n=418)			2013 (n=593)			2014 (n=119)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
POLLO DA CARNE	23	0	46	29	4	57	16	2	16
GALLINA OVAIOLA	76	7	44	133	6	37	28	0	5
POLLA STRA	14	0	7	22	8	0	5	0	0
PULCINO	76	3	39	104	2	53	15	2	5
RIPRODUTTORE	17	2	11	36	0	15	9	0	2
TACCHINO	28	0	25	39	2	46	3	1	10
<b>TOTALE n.</b>	<b>234</b>	<b>12</b>	<b>172</b>	<b>363</b>	<b>22</b>	<b>208</b>	<b>76</b>	<b>5</b>	<b>38</b>
<b>TOTALE %</b>	<b>(56%)</b>	<b>(3%)</b>	<b>(41%)</b>	<b>(61%)</b>	<b>(4%)</b>	<b>(35%)</b>	<b>(64%)</b>	<b>(4%)</b>	<b>(32%)</b>

**Tabella 6:** sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti dell'associazione LINCOMICINA+SPECTINOMICINA.

	2012 (n=418)			2013 (n=582)			2014 (n=119)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
POLLO DA CARNE	33	6	18	51	7	30	16	2	8
GALLINA OVAIOIA	88	11	23	128	10	26	20	2	4
POLLASTRA	18	1	5	30	2	6	6	0	1
PULCINO	80	10	41	95	13	41	24	2	13
RIPRODUTTORE	28	1	2	45	3	9	6	0	1
TACCHINO	39	5	9	59	1	26	6	0	8
<b>TOTALE n.</b>	<b>286</b>	<b>34</b>	<b>98</b>	<b>408</b>	<b>36</b>	<b>138</b>	<b>78</b>	<b>6</b>	<b>35</b>
<b>TOTALE %</b>	<b>(68%)</b>	<b>(8%)</b>	<b>(24%)</b>	<b>(70%)</b>	<b>(6%)</b>	<b>(24%)</b>	<b>(66%)</b>	<b>(5%)</b>	<b>(29%)</b>

**Tabella 7:** sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti dell'associazione TRIMETOPRIM+SULFAMETOSSAZOLO.

	2012 (n=417)			2013 (n=593)			2014 (n=119)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
POLLO DA CARNE	23	0	35	23	0	67	14	2	18
GALLINA OVAIOIA	64	5	56	122	4	46	23	1	8
POLLASTRA	10	0	11	20	0	15	4	0	1
PULCINO	79	2	50	93	2	54	14	0	8
RIPRODUTTORE	25	0	4	47	1	12	9	0	3
TACCHINO	22	0	31	44	1	42	4	0	10
<b>TOTALE n.</b>	<b>223</b>	<b>7</b>	<b>187</b>	<b>349</b>	<b>8</b>	<b>236</b>	<b>68</b>	<b>3</b>	<b>48</b>
<b>TOTALE %</b>	<b>(53%)</b>	<b>(2%)</b>	<b>(45%)</b>	<b>(59%)</b>	<b>(1%)</b>	<b>(40%)</b>	<b>(57%)</b>	<b>(3%)</b>	<b>(40%)</b>

**Tabella 8:** minima concentrazione inibente nei confronti di ceppi di *E.coli* isolati da avifauna selvatica e da alcuni allevamenti intensivi.

	ANTIBIOTICI																		
	PEN >2 R	AMX 8 I	ENR ≤0,25 S	DOX ≤2 S	TLS ≤0,25 S	TET ≤2 S	TLS >1R	TILM >16 R	NEO ≤8 S	LIS ≤8/32 S	T/S ≤0,5/9,5 S	OXA >2 R	COL ≤2 S	ERY >4 R	TIA >16 R	LIN >4 R	STR ≤200 S	RAM ≤50 S	SPT ≤32 S
gallinella d'acqua	>2	4	<0,25	<2	>0,5	2	<1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	32
gazza	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
merlo	>2	<2	<0,25	4	>0,5	4	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
gruccione	>2	<2	<0,25	<2	>0,5	4	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
civetta	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
sparviero	>2	<2	<0,25	4	>0,5	4	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
gazza	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
martin pescatore	>2	8	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
gazza	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
civetta	>2	4	<0,25	4	>0,5	4	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
storno	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
ghiandaia	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
ghiandaia	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
gazza	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
ghiandaia	>2	4	1	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
ghiandaia	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	<32
cornacchia grigia	>2	>16	>2	8	>0,5	>8	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	>64
civetta	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
gazza	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
gazza	>2	>16	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
cornacchia grigia	>2	<2	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	>64
ghiandaia	>2	16	<0,25	>2	>0,5	>2	<1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
cornacchia grigia	>2	<2	<0,25	<2	>0,5	4	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	>64
gazza	>2	>16	<0,25	>8	>0,5	>8	>1	>16	>8	>8/32	>2/38	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64
tarabusino africano	>2	<2	<0,25	<2	>0,5	<2	>1	>16	>8	>8/32	>0,5/9,5	>2	>2	>4	>16	>4	>200	>50	64

Seguito della tabella 8.

	ANTIBIOTICI														SPT				
	PEN	AMX	ENR	DOX	TLS	TET	TLS	TILM	NEO	LIS	T/S	OXA	COL	ERY	TIA	LIN	STR	RAM	
BREAKPOINTS	>2 R	8 I	≤0,25 S	≤2 S	≤0,25 S	≤2 S	>16 R	≤8 S	≤8/32 S	≤0,5/9,5 S	>2 R	≤2 S	>4 R	>16 R	>4 R	>4 R	≤200 S	≤50 S	≤32 S
ghiandaia	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	<200	<50	64
gufo comune	>2	4	<0,25	<2	>0,5	8	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
rondone	>2	<2	<0,25	<2	>0,5	<2	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
ghiandaia	>2	>16	<0,25	<2	>0,5	<2	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
gazza	>2	>16	<0,25	>8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	2/38	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
gabbiano corallino	>2	<2	<0,25	4	>0,5	8	>16	<8	>8/32	1/19	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
gazza	>2	>16	0,5	>8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
gazza	>2	<2	<0,25	<2	>0,5	<2	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
falco	>2	<2	>2	>8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	>2/38	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
pollo	>2	>16	>2	8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
pollo	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
tacchino	>2	>16	>2	>8	>0,5	>8	>16	16	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
tacchino	>2	>16	>2	8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	>2/38	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
pollo	>2	>16	>2	>8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	>2/38	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
pollo	>2	>16	>2	8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
pollo	>2	<2	<0,25	>8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
tacchino	>2	>16	>2	8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
pollo	>2	>16	<0,25	8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	>2/38	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64
quaglia	>2	>16	>2	>8	>0,5	>8	>16	<8	>8/32	>2/38	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	>64
anatra	>2	4	<0,25	<2	>0,5	<2	>16	<8	>8/32	<0,5/9,5	>2	<2	>4	>16	>4	>4	>200	<50	64

Tabella 9: riepilogo della sensibilità antibiotica dei ceppi di *E.coli* isolati da avifauna selvatica e da alcuni allevamenti intensivi.

ANTIBIOTICO	Avifauna selvatica			Specie domestiche allevate		
	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)
AMOXICILLINA	7 (21)	1 (3)	26 (76)	8 (73)	0	3 (27)
COLISTINA	0	0	34 (100)	0	0	11 (100)
DOXICILINA	8 (24)	0	26 (76)	9 (82)	0	2 (18)
ENROFLOXACINA	4 (12)	0	30 (88)	7 (64)	0	4 (36)
ERITROMICINA	34 (100)	0	0	11 (100)	0	0
LINCOMICINA	34 (100)	0	0	11 (100)	0	0
LINCOMICINA+ SPECTINOMICINA	27 (79)	0	7 (21)	10 (91)	0	1 (9)
NEOMICINA	0	0	34 (100)	1 (9)	0	10 (91)
OXACILLINA	34 (100)	0	0	11 (100)	0	0
PENICILLINA G	34 (100)	0	0	11 (100)	0	0
RIFAMPICINA	0	0	34 (100)	0	0	11 (100)
SPECTINOMICINA	25 (74)	0	9 (26)	11 (100)	0	0
STREPTOMICINA	3 (9)	0	31 (91)	3 (27)	0	8 (73)
TETRACICLINA	13 (38)	0	21 (62)	9 (82)	0	2 (18)
TIAMULINA	34 (100)	0	0	11 (100)	0	0
TILMICOSINA	34 (100)	0	0	11 (100)	0	0
TILOSINA	34 (100)	0	0	11 (100)	0	0
TRIMEOTPRIM+ SULFAMETOSSAZOLO	4 (12)	0	30 (88)	4 (36)	0	7 (64)

### DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Pur con tutti i suoi limiti, l'antibiogramma rappresenta ancora oggi uno strumento per valutare, in tempi rapidi e con costi ragionevoli, la sensibilità di un ceppo batterico nei confronti di un pannello di antibiotici/chemioterapici. Si tratta ovviamente solo di una prova *in vitro* di tipo qualitativo. La scelta finale dell'antibiotico da impiegare deve comprendere ulteriori valutazioni a cominciare dal tipo di patologia osservata in campo e dalle caratteristiche di farmacocinetica (assorbimento intestinale e distribuzione tissutale) dei principi attivi disponibili. Essendo adottato in modo sufficientemente standardizzato dalla maggior parte dei laboratori diagnostici, l'antibiogramma può rappresentare un valido strumento per valutare nel tempo l'andamento dei profili di sensibilità antibiotica dei principali microrganismi patogeni e per indirizzare verso indagini di tipo molecolare quei ceppi che presentano, ad esempio, resistenze multiple. Nel presente studio sono stati raccolti i dati relativi ad oltre 1100 antibiogrammi eseguiti su ceppi di *E.coli* isolati dal 2012 ad oggi da casi clinici di colisetticemia in differenti tipologie di allevamento del pollo e del tacchino. Da questa indagine emerge

come, nel complesso, la sensibilità *in vitro* dei principali antibiotici considerati non abbia subito modificazioni di rilievo negli ultimi due anni. Aminosidina e colistina presentano la maggior prevalenza di sensibilità. Quest'ultima si attesta invece, nei confronti di enrofloxacin, si tra il 73% e il 79%; quest'ultimo dato, se valutato per tipologia di allevamento, evidenzia tuttavia un incremento di ceppi resistenti nel pollo da carne e nel tacchino. I ceppi sensibili alla flumequina sono risultati compresi, nel periodo considerato, tra 56% e 64%, quelli sensibili all'associazione lincomicina+spectinomicina tra 66% e 70% e quelli sensibili all'associazione trimetopim+sulfametossazolo tra 53% e 59%. La sensibilità ad amoxicillina risulta più bassa (22% nel 2012 e 25% nel 2013). Un dato importante (non pubblicato in questo lavoro) riguarda il crescente isolamento di ceppi di *E.coli* contemporaneamente resistenti a diversi principi attivi.

Nella seconda parte dello studio è stato considerato il ruolo dell'avifauna selvatica come possibile serbatoio di determinati dell'antibiotico-resistenza. Si tratta di un fenomeno importante (considerando le crescenti interazioni tra gli habitat in cui vive la fauna selvatica e le attività umane e zootecniche), ma sul quale i dati disponibili sono ancora limitati. I risultati ottenuti in questo studio (riguardanti 34 ceppi di *E.coli* isolati da specie diverse) hanno evidenziato fenomeni di resistenza nei confronti di 15 dei 18 antibiotici testati. In particolare è da sottolineare l'isolamento di ceppi resistenti a molecole impiegate nei confronti di batteri Gram-negativi come enrofloxacin (12%), spectinomicina (74%) e streptomycin (9%). Sebbene l'avifauna selvatica non venga naturalmente in contatto con molecole ad azione antimicrobica, questi animali possono essere colonizzati da batteri resistenti e possono perciò svolgere un ruolo di serbatoio di geni di antibiotico-resistenza. E' perciò importante analizzare l'epidemiologia e i meccanismi di emergenza e diffusione di questo fenomeno. Il monitoraggio dei livelli di antibiotico-resistenza in batteri commensali isolati da specie selvatiche può fornire un prezioso contributo allo studio dell'evoluzione dei meccanismi di resistenza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andrews J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration; *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5-16
2. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 2006a. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline (M45-A, Vol. 26 No. 19). CLSI, Wayne, PA.
3. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 2006b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement. (M100-S16, Vol 26 No 3). CLSI, Wayne, PA.
4. Kitadai N, Obi T., Yamashita S., Murase T., Takase K. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from faeces of wild cranes migrating to Kagoshima. *Japan J. Vet. Med. Sci* 74:395-397.
5. Radimersky T., Frolkova P., Janoszowska D., Dolejska M., Svec P., Roubalova E. (2010). Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*) in feral pigeons. *Journal of Applied Microbiology* 109:1687-1695.
6. Santos T, Sila N., Igrejas G., Rodrigues P. (2013). Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe* 24:25-31.

## **INDICE DEGLI AUTORI**

Agnoletti F. 105, 110, 134  
 Alessandri E. 35

Bacchin C. 105, 134  
 Baldasso E. 184  
 Bano L. 105, 110, 134  
 Barbieri I. 138, 155  
 Barco L. 128  
 Berto G. 105, 110, 134  
 Boniotti B. 177  
 Borrelli L. 128, 131  
 Boscaro G. 120  
 Brunetta R. 134

Camarda A. 115, 123  
 Caputo V. 128  
 Caroli A. 115, 123  
 Casadio M. 138, 145, 155, 172, 198, 204  
 Cassandro M. 69  
 Catania S. 120, 184, 189  
 Ceroni S. 198  
 Ceruti R. 177  
 Ciccarelli F. 131  
 Circella E. 115, 123  
 Compagnoni E. 198  
 Cordioli P. 177

De Luca Bossa L. M. 128, 131  
 Della Valentina M. 35  
 Dipineto L. 128, 131  
 Drigo I. 105, 110, 134  
 Drigo M. 192

Fasoli P. 177, 192  
 Ferrante V. 93  
 Ferro T. 110  
 Fincato A. 184  
 Fiorentini L. 79, 138, 145, 155, 172, 187, 196, 198, 204  
 Fioretti A. 128, 131  
 Flaminio B. 120, 184  
 Fracas V. 105  
 Furlan G. 105

Gargiulo A. 128  
 Gavazzi L. 25, 177  
 Giovanardi D. 49  
 Gobbo F. 120, 189  
 Guolo A. 134

Legretto M. 115, 123  
 Longoni C. 172, 192

Marcon B. 110, 134  
 Marino M. 115, 123  
 Massi P. 79, 138, 145, 155, 172, 187, 196, 198, 204  
 Matucci A. 189  
 Menna L. F. 128, 131  
 Milandri C. 145  
 Morandini E. 25, 49  
 Moreno A. 177  
 Moret C. 105  
 Moronato M. L. 184, 189

Pampiglione G. 187  
 Pascoletti S. 134  
 Pedicone R. 59  
 Pezzotti R. 192  
 Pugliese N. 115, 123  
 Puiatti C. 105

Qualtieri K. 184

Ragazzini A. 49  
 Raia P. 131  
 Recordati C. 192  
 Ricci G. 145  
 Rodio S. 189  
 Rosetti M. 145  
 Russo E. 172, 192  
 Russo T. P. 128, 131

Santaniello A. 131  
 Santone C. 120  
 Sattin E. 189  
 Scaravelli D. 187, 196  
 Scolari S. 49  
 Sturaro A. 120

Taddei R. 79, 138  
 Tarticchio G. 110  
 Tonon E. 110  
 Tosi G. 79, 138, 145, 155, 172, 187, 196, 198, 204

Usberti R. 145

Vascellari M. 110  
 Viel L. 105, 134

# Protectotype

Tutto ciò  
di cui hai bisogno  
per **proteggerti**  
dalla **Bronchite**  
**Infettiva**



MSD Animal Health S.r.l.  
Via Fimelli Carvino, Centro Direzionale Milano Due  
Palazzo Canova, 20090 Segrate (MI)

 **MSD**  
Animal Health





Ci prendiamo cura dei vostri animali da reddito come fossero i nostri.

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



Largo U. Boccioni, 1 - 21040 Origgio (Va)  
www.saluteanimale.novartis.it  
Servizio Tecnico 02.96542537



INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI ANIMAL HEALTH PRODUCT



### > RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TREI e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.



Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfere da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

INDUSTRIA ITALIANA  
INTEGRATORI TREI S.p.A.

AMMINISTRAZIONE  
E STABILIMENTO  
ADMIN. AND PRODUCTION PLANT  
Via Affarosa 4  
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:  
+39 0522 640711

FAX:  
+39 0522 649757  
+39 0522 640716

info@treivet.com  
www.treivet.com

**SOLUZIONI DI OGGI  
PER PROBLEMI DI OGGI**

**VACCINI  
DIAGNOSTICI  
COCCIDIOSTATICI  
VACCINAZIONE IN-OVO**

Zoetis Italia Srl - Via Adriatico Costa 41 M - 00192 Roma - www.zoetis.it

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

**zoetis**

Finito di stampare  
nel mese di Aprile 2014  
da La Ducale Srl - Parma