



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE    ATTI del LIV Convegno Annuale



# SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

## Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 2015



## LIV Convegno Annuale

Forlì, 16-17 Aprile 2015

**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2015**

**Forlì,  
16-17 Aprile 2015**



## INDICE

Prefazione .....	pag. 15
------------------	---------

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

## INCONTRO

### *“Stato sanitario dell’avicoltura italiana: focus sulle principali malattie osservate durante il 2014”*

- STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE  
*Luigi Gavazzi* ..... pag. 21
- PROBLEMI SANITARI IN GALLINE OVAIOLE IN ITALIA  
*Alberto Treccani, Alessandro Scolari* ..... pag. 31
- PATOLOGIE DEL TACCHINO DA CARNE  
*Stefano Serafino* ..... pag. 39
- LE PRINCIPALI PROBLEMATICHE SANITARIE DELLE SPECIE “MINORI”  
*Emilio Morandini* ..... pag. 45

## CONVEGNO

### *“Strategie alternative o complementari all’uso degli antimicrobici in avicoltura”*

- ALIMENTAZIONE E SALUTE INTESTINALE  
*Franco Calini* ..... pag. 57
- IL CONTROLLO DELL’AMBIENTE NELLA PREVENZIONE DELLE  
PATOLOGIE  
*Federico Pastò* ..... pag. 71
- L’UTILIZZO DELLA VACCINAZIONE COME STRUMENTO DI RIDUZIONE  
DEL FARMACO  
*Paola Massi* ..... pag. 81



## ATTI DEL LIV CONVEGNO ANNUALE

Forlì, 16-17 Aprile 2015

### COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- *Bano L., Pascoletti S., Drigo I., Brunetta R., Berto G., Catania S., Viel L., Agnoletti F.*  
APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE DI UN PROTOCOLLO DI PCR IN GRADO  
DI DISCRIMINARE IL CEPPO VACCINALE SG9R..... **pag. 95**
- *Bano L., Tonon E., Berto G., Drigo I., De Zan G., Bonfante F., Terregino C., Cattoli G.,  
Vascellari M., Mazzolini E., Agnoletti F.*  
VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ANTICORPALE DI POLLI DA CARNE  
INFETTATI SPERIMENTALMENTE CON *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*  
NETB-POSITIVO..... **pag. 100**
- *Berto G., Giovanardi D., Drigo I., De Vidi B., Agnoletti F., Viel L., Capello K., Bano L.*  
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM*  
*PERFRINGENS* ISOLATI DA TACCHINO..... **pag. 107**
- *Bilato D., Tosi G., Parini M., Paoli A., Fiorentini L., Cantini F., Massi P., Amadori M.*  
APPLICAZIONE DI MODELLI DI VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ  
ANTIBATTERICA DI MONOGLICERIDI DEGLI ACIDI GRASSI A CORTA E  
MEDIA CATENA NEI CONFRONTI DI *SALMONELLA* SPP. .... **pag. 112**
- *Casagrande Proietti P., de Luca S., Comitini F., Pergola S., Galli R., Marenzoni M.L.,  
Franciosini M.P.*  
VALUTAZIONE DI ANTIBIOTICO RESISTENZA E PROFILO GENETICO DI  
*CAMPYLOBACTER* SPP. TERMOFILII ISOLATI DA POLLI BROILER... **pag. 117**
- *Catania S., Moronato M. L., Fasoli P., Facchetti G., Rodio S., Gobbo F.*  
VACCINAZIONE CON CEPPO TERMOSENSIBILE DI *MYCOPLASMA*  
*SYNOVIAE* IN UN GRUPPO DI POLLI RIPRODUTTORI PESANTI: DATI  
PRELIMINARI..... **pag. 124**
- *Cesari V., Giardini A., Gallazzi D., Toschi I.*  
STUDIO SPERIMENTALE PRELIMINARE DELL'EFFETTO  
DELL'ADDIZIONE ALL'ACQUA DI BEVANDA DI *LACTOBACILLUS*  
*ACIDOPHILUS* D2/CSL SULLE PERFORMANCE PRODUTTIVE E SULLA  
MICROFLORA INTESTINALE DEL POLLO DA CARNE (**POSTER**)... **pag. 127**
- *Circella E., Marino M., Caroli A., Legretto M., Pugliese N., Camarda A.*  
TRASMISSIONE VERTICALE: UNA POSSIBILE VIA DI INFEZIONE PER I  
CIRCOVIRUS?..... **pag. 132**

- *D'Andreano S., Sánchez Bonastre A., Cuscó Martí A., Cecilian F., Francino O., Grilli G., Saita M., Lecchi C.*  
THE TURKEY INTESTINAL MICROBIOME: A NEXT GENERATION SEQUENCING APPROACH **(POSTER)** ..... pag. 139
- *De Luca Bossa L.M., Dipineto L., Mennonna G., Meomartino L., Paciello O., Ciccarelli F., De Biase D., Raia P., Caputo V., Fioretti A.*  
UN CASO DI OSTEOSARCOMA NEL GHEPPIO  
(*FALCO TINNUNCULUS*) **(POSTER)** ..... pag. 143
- *Di Martino G., Piccirillo A., Gallina A., Comin D., Capello K., Montesissa C., Bonfanti L.*  
QUALITÀ DELL'ACQUA IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI IN VENETO: CONFRONTO CHIMICO-FISICO E MICROBIOLOGICO TRA APPROVVIGIONAMENTO CON POZZO E CON ACQUEDOTTO ..... pag. 145
- *Fiorentini L., Taddei R., Casadio M., Parigi M., Vicari N., Massi P., Tosi G.*  
VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ANTIBIOTICA DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE ALLEVATE E DA AVIFAUNA SELVATICA ..... pag. 152
- *Franzo G., Naylor C.J., Drigo M., Croville G., Ducatez M.F., Catelli E., Laconi A., Cecchinato M.*  
IDENTIFICAZIONE MEDIANTE *NEXT GENERATION SEQUENCING* DI SOTTOPOPOLAZIONI VIRALI IN UN VACCINO VIVO ATTENUATO PER METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO B E LORO IMPLICAZIONE NEL FENOMENO DI REVERSIONE A VIRULENZA ..... pag. 162
- *Giacomelli S., Bianchi A., Bertolotti I., Nicastro M., Ferrari N., Gallazzi D., Grilli G.*  
INFESTAZIONE DA PHTHIRAPTERA NELL'AVIFAUNA ITALIANA **(POSTER)** ..... pag. 171
- *Grilli G., Zullo F., Ferrazzi V., Gallazzi D.*  
VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA AVIFAUNA STANZIALE E MIGRATORIA CATTURATA PRESSO L'ISOLA DELL'ASINARA **(POSTER)** ..... pag. 180
- *Guerra P., Radeghieri P.*  
CONTROLLO INTEGRATO DI *DERMANYSSUS GALLINAE* CON ELEVATE TEMPERATURE ALL'INTERNO DI ALLEVAMENTI AVICOLI ... pag. 185
- *Listorti V., Franzo G., Lupini C., Naylor C.J., Laconi A., Felice V., Drigo M., Catelli E., Cecchinato M.*  
SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA DI UN CEPPO DI IBV GENOTIPO Q1-LIKE ISOLATO IN ITALIA NEL 2013 ..... pag. 194

- *Lupini C., Felice V., Bonci M., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Morandini E., Catelli E.*  
DATI EPIDEMIOLOGICI SULLA CIRCOLAZIONE IN ITALIA DEL NUOVO  
GENOTIPO IBDV ITA ..... **pag. 201**
  - *Marino M., Pugliese N., Circella E., Caroli A., Legretto M., De Virgilio C., Romito D., Camarda A.*  
NUOVO PROTOCOLLO DI QPCR PER LA DIAGNOSI DI *SALMONELLA*  
*ENTERICA* SEROVAR *GALLINARUM*..... **pag. 208**
  - *Marques A.T., Lecchi C., Grilli G., Giudice C., Restelli L., Rota Nodari S., Vinco L.J., Cecilian F.*  
RESPONSE TO ROAD TRANSPORTATION IN TURKEY (*MELEAGRIS*  
*GALLOPAVO*): THE ACUTE PHASE PROTEIN EXPRESSION IN LIVER AND  
ADIPOSE TISSUE ..... **pag. 215**
  - *Massi P., Barbieri I., Fiorentini L., Casadio M., Parigi M., Tosi G.*  
ANALISI MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE  
INFETTIVA AVIARE NEGLI ANNI 2013 E 2014. CONSIDERAZIONI SUI  
GENOTIPI CIRCOLANTI IN ITALIA E IN ALTRI PAESI EUROPEI ED EXTRA-  
EUROPEI ..... **pag. 220**
  - *Mescolini G., Lupini C., Felice V., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Catelli E.*  
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPPO *MILD* DEL VIRUS  
DELLA MALATTIA DI MAREK EVIDENZIATO IN POLLI RURALI CON  
FORMA NERVOSA ..... **pag. 230**
  - *Pampiglione G., Trevisani G., Scaravelli D.*  
IL MONITORAGGIO QUALE ELEMENTO ESSENZIALE NEL CONTENI-  
MENTO DEL *DERMANYSSUS GALLINAE* ..... **pag. 245**
  - *Russo E., Dalle Zotte A., Recordati C., Longoni C., Tasoniero G., Catelli E., Felice V., Cecchinato M.*  
INSORGENZA E PREVALENZA DI “WHITE STRIPING” IN BROILER  
PESANTI SOTTOPOSTI A DIVERSI PROGRAMMI DI CONTROLLO DELLA  
COCCIDIOSI ..... **pag. 248**
  - *Scaravelli D., Terregino C., Tosi G., Massi P.*  
INDAGINI SU *STREPTOPELIA DECAOCTO* CONFERITE ALL’ISTITUTO  
ZOOFILATTICO DI FORLÌ NEGLI ANNI 2011-2014 ..... **pag. 254**
  - *Terregino C., Toffan A., Grossele B., Leardini S.*  
SVILUPPO DI UN METODO DI PROVA PER L’IDENTIFICAZIONE DI ANTI-  
CORPI SIERONEUTRALIZZANTI NEI CONFRONTI DEI *FOWL ADENOVI-*  
*RUS A* NELLA FARAONA (*NUMIDA MELEAGRIS*) (**POSTER**) ..... **pag. 259**
- INDICE DEGLI AUTORI** ..... **pag. 265**



HEALTHY  
CHICKENS

Infectious bronchitis under control from the hatchery.



*Il tuo partner in  
Terapia Veterinaria  
e Nutrizione Animale*



Distributore esclusivo per l'Italia



*Italian pharmaceutical  
company since 1976*



# 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%



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

**Elanco**<sup>TM</sup>

**KNOWLEDGE**  
SOLUTIONS

**INTESTINAL  
PROTECTION  
SYSTEM**

**Elanco**  
**E=I<sup>2</sup>**

**HEALTH  
TRACKING  
SYSTEM**

**HTS** 

**ZERO DAY  
WITHDRAWAL  
SOLUTIONS**



**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 e-mail: Elanco\_FA\_Italia@elanco.com

  
10 **FULL VALUE POULTRY**<sup>TM</sup>

**Elanco**

ITBRLEBR00053



# 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

# Fatro una trasparenza Visibile

Eccellenza del Made in Italy  
dal 1947

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



la salute animale per la salute dell'uomo

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2015 sono realizzate grazie al contributo di:

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





## PREFAZIONE

L'elevata professionalità di tutti gli attori coinvolti nella filiera avicola, sia privati che pubblici, ha permesso a questa branca della zootecnia nazionale di essere sempre ai massimi livelli qualitativi nella gestione dello stato sanitario ed in grado di fronteggiare anche le emergenze sanitarie che negli anni si sono presentate.

La Società Italiana di Patologia Aviaria si è sempre impegnata nell'organizzare incontri scientifici e divulgativi al fine di essere sempre all'altezza di questa professionalità grazie allo stimolo dei soci e all'impegno del consiglio direttivo. Negli ultimi anni abbiamo affrontato, con tavole rotonde e convegni, gli aspetti teorici e pratici inerenti l'antibiotico resistenza e le implicazioni che possono presentarsi nel comparto della sanità pubblica, passando anche attraverso la gestione dell'ambiente, dell'alimentazione e di altre tecniche che possono agevolare la profilassi in funzione di una diminuzione dell'uso degli antimicrobici.

Quest'anno ci è sembrato opportuno discutere della gestione sanitaria, non più considerando la problematica a livello di singolo allevamento ma affrontando il problema della gestione delle patologie infettive a livello territoriale, cercando di proporre quindi dei modelli di gestione attraverso percorsi integrati che tengano conto delle situazioni epidemiologiche e dei mezzi a nostra disposizione per la profilassi e terapia. Questo complesso argomento verrà esposto da relatori qualificati che presenteranno anche degli esempi già applicati in alcune regioni nel nostro Paese. Questo approccio sanitario risulta essere vincente non solo per le malattie regolamentate, ma anche per tutte le patologie infettive comunemente riscontrabili nell'allevamento avicolo.

Questo incontro, così come le altre attività congressuali che negli anni si sono susseguite, è reso 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.

Il 2015 è anche l'anno in cui si terranno le elezioni del Presidente e del Consiglio Direttivo per il triennio 2016-2018.

Ringrazio dunque i Soci che hanno riposto in me e nei consiglieri la loro fiducia in questi 6 anni nella speranza che il nostro lavoro, sicuramente non perfetto, sia stato comunque all'altezza di una società scientifica storica come la SIPA.

*Dott. Guido Grilli*  
*Presidente SIPA*



# ATTI DEL LIII CONVEGNO ANNUALE

Salsomaggiore Terme (PR), 8-9 Maggio 2014



## **INCONTRO**

**“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sulle principali malattie osservate  
durante il 2014”**





**LUIGI GAVAZZI**  
**Stato sanitario del pollo da carne**

## STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE

Luigi Gavazzi

Salsomaggiore Terme, 8 Maggio 2014

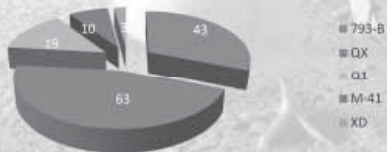
## IBV

- Virus capace di modificarsi sia per fenomeni di mutazione che per riassortimento
- Variabilità antigenica dei ceppi virali coinvolti
- Presidi immunizzanti con il ceppo classico M41 ed eventualmente con i ceppi varianti
- Tropismo virale sempre più variabile, differenti forme cliniche, respiratorie e renali
- La variabilità virale riconducibile alla modificazioni a carico della proteina S degli spikes in particolare della S1 (una delle due sub-unità)

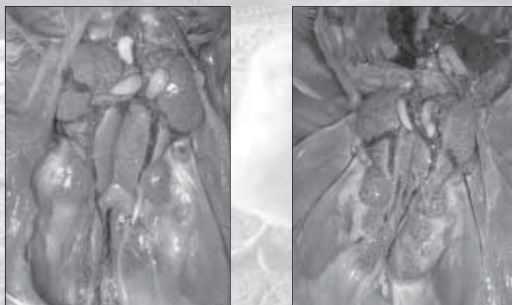
## IBV

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

Sierotipi

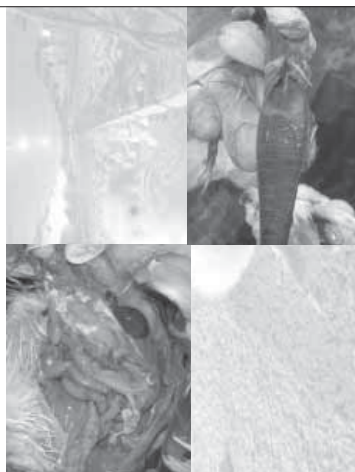


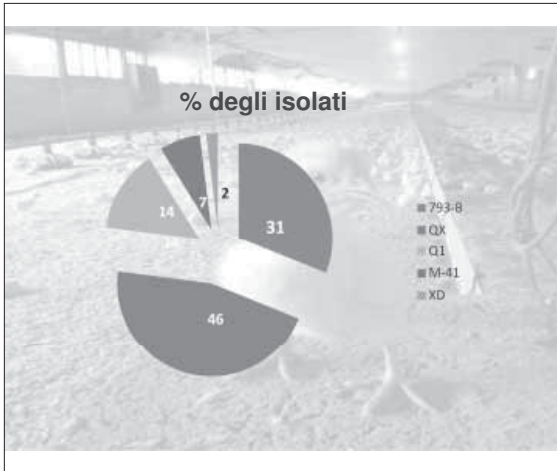
## QX



## XD 3


- Forme cliniche respiratorie senza interessamento del sistema renale
- Sintomatologia non molto grave, ma complicata da altri agenti virali o batterici
- L'apparizione di nuove varianti antigeniche rende difficoltosa la scelta di piani di profilassi
- Fondamentale investigare nelle varie regioni per vedere la circolazione virale in modo tale da operare con adeguati piani vaccinali







## IBDV

- RNA
- Famiglia Birnaviridae
- Privo di envelope
- Due sierotipi: sierotipo 1 ( ceppi classici, varianti e very virulent) e sierotipo 2 (ceppi apatogeni)
- Ceppi varianti comparsi negli anni '80 negli USA
- Danno a carico della Borsa di Fabrizio.
- Immunosoppressione
- Il genoma è composto da due segmenti di RNA a doppio filamento

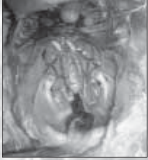

## IBDV

- Segmento A codifica tre proteine strutturali (VP2,VP3 e VP4) e una proteina non strutturale (VP5) che ha un ruolo importante nella patogenesi
- Segmento B codifica la polimerasi virale (VP1)
- VP2 azione componente immunogena
- In Italia prevalente la circolazione di vvIBDV
- Ceppi correlati a virus vaccinali
- Ceppi correlati a ceppi classici ma si distinguono da questi



## IBDV

- Incubatoio: ricombinante o vaccino immuno-complesso
- Allevamento vaccino vivo(intermedio)
- Valutata tramite RT-PCR la presenza di IBDV in gruppi di polli da carne che manifestano sintomatologia e quadro anatomo-patologico riconducibile a bursite infettiva
- Gruppi di polli con assenza di quadro clinico ed anatomo-patologico ma con stato sanitario scadente e ridotte performance






## IBDV

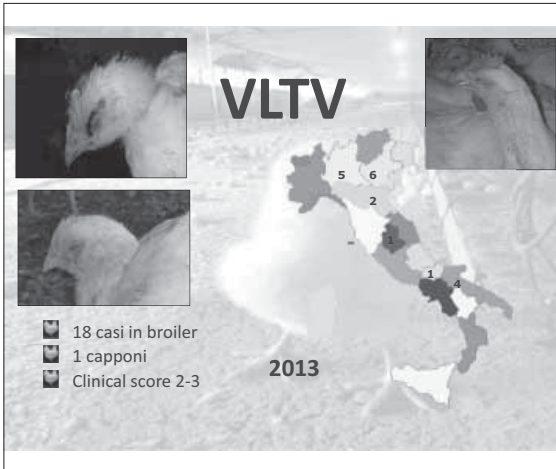
- 32, vv IBDV
- 12 ITA-03 variante atipica

## vvIBDV





### METAPNEUMOVIRUS AVIARE

- Virus RNA a singolo filamento e polarità negativa
- 4 sottotipi: A,B,C e D (primi due maggiormente diffusi a livello mondiale)
- Il sottotipo B è quello maggiormente diffuso in Italia, soprattutto al nord dove la densità avicola di area è rilevante
- Tacchino (TRT)

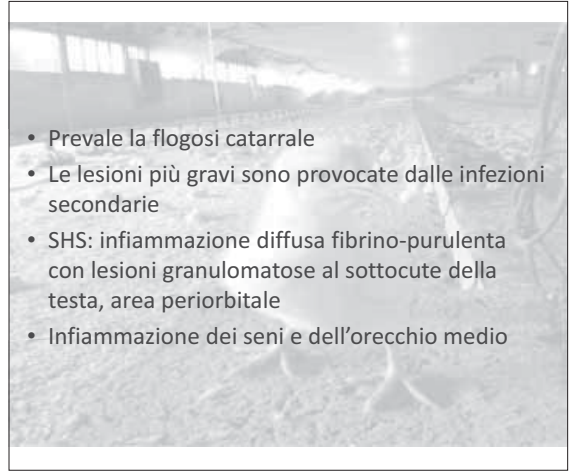
### METAPNEUMOVIRUS AVIARE (AMPV)

- Faraona
- Pollo, malattia clinica meno grave rispetto il tacchino sempre che non sia complicata da altri fattori, in particolare E.Coli, Sindrome della Testa Gonfia (SHS)
- Perdite economiche nei casi gravi rilevanti
- Grande capacità diffusiva e contagiosità del virus

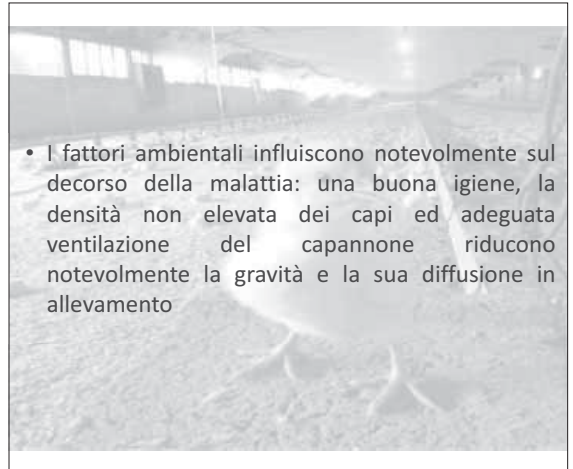
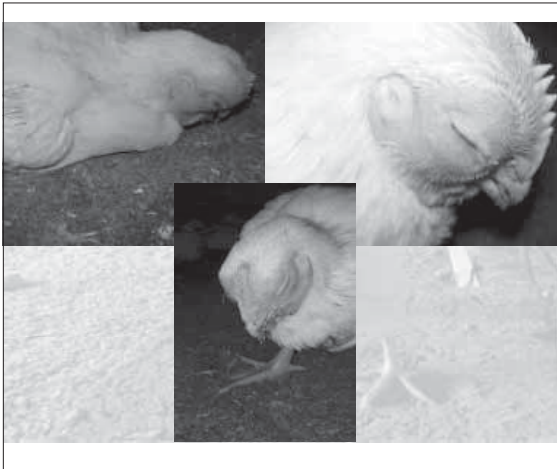
- Trasmissione diretta
- Trasmissione indiretta
- Attenzione al personale, attrezzature e mezzi di trasporto

### Quadro clinico

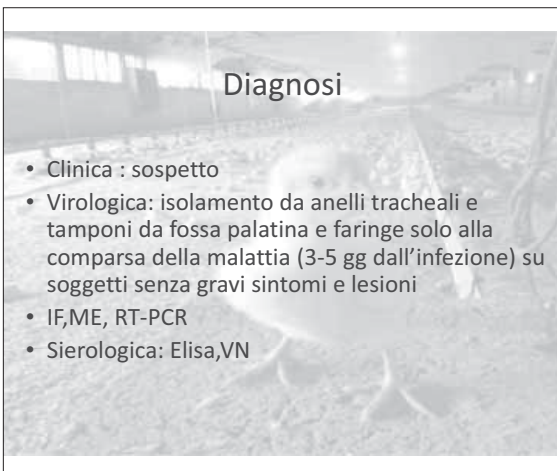
- Periodo di incubazione circa 4 gg
- Depressione
- Edema periorbitale e della testa
- Sintomi respiratori diffusi
- Mortalità assente oppure aggravata dalla patogenicità del ceppo di *E. Coli*



- Prevalenza di flogosi catarrale
- Le lesioni più gravi sono provocate dalle infezioni secondarie
- SHS: infiammazione diffusa fibrino-purulenta con lesioni granulomatose al sottocute della testa, area periorbitale
- Infiammazione dei seni e dell'orecchio medio

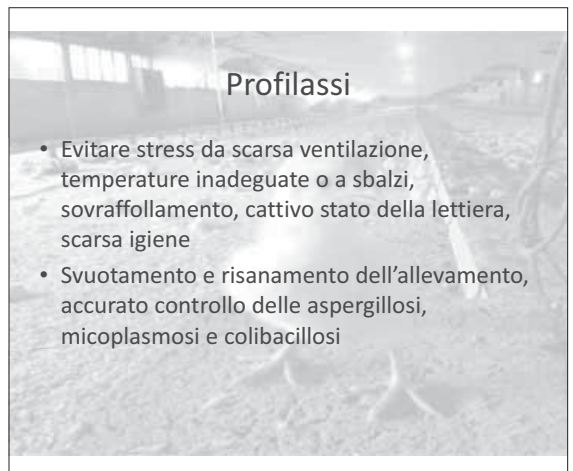


- I fattori ambientali influiscono notevolmente sul decorso della malattia: una buona igiene, la densità non elevata dei capi ed adeguata ventilazione del capannone riducono notevolmente la gravità e la sua diffusione in allevamento



## Diagnosi

- Clinica : sospetto
- Virologica: isolamento da anelli tracheali e tamponi da fossa palatina e faringe solo alla comparsa della malattia (3-5 gg dall'infezione) su soggetti senza gravi sintomi e lesioni
- IF,ME, RT-PCR
- Sierologica: Elisa,VN



## Profilassi

- Evitare stress da scarsa ventilazione, temperature inadeguate o a sbalzi, sovraffollamento, cattivo stato della lettiera, scarsa igiene
- Svuotamento e risanamento dell'allevamento, accurato controllo delle aspergillosi, micoplasmosi e colibacillosi



## CASI CLINICI DI TENOSINOVITE DA VARIANTI DI REOVIRUS

- Malattia del pollo molto diffusa
- Artrosinovite e tenosinovite
- Edema del tendine flessore digitale
- Rottura del tendine
- Idropericardio



500 um

## Epizootologia

- Trasmissione verticale e orizzontale
- La malattia è più grave nei soggetti giovani rispetto i più vecchi

500 um

## Virus

- RNA – senza envelope
- Il genoma è costituito da 10 segmenti:
  - ✓ 3 large (L1,L2,L3)
  - ✓ 3 medium (M1,M2,M3)
  - ✓ 4 small (S1,S2,S3,S4)
- S1 codifica la proteina Sigma C
- La proteina Sigma C è importante per la diagnosi:
  - ✓ Trimero
  - ✓ Serve per l'attacco del virus
  - ✓ Neutralizza gli anticorpi
  - ✓ Alta variabilità di sequenza



500 um

- Incidenza di casi in aumento in gruppi da 2-8 settimane
- RT-PCR amplifica la proteina Sigma C:
  - ✓ Comparazione della Sigma C dei diversi Reovirus
- Due gruppi:
  - Gp1 – con omologia < 50% al ceppo vaccinale (più diffuso)
  - Gp2 – con omologia dell'80% al ceppo vaccinale

500 um

## Quadro clinico

- Animali a terra
- Scarsa uniformità
- Debolezza degli arti
- Crescita stentata
- Edema del garretto
- Aumento della mortalità (scarti)
- Aumento dello scarto di macellazione
- Diffusa in diversi stati degli USA (AL,AR,FL,GA, IA,MS,KY,NC,SC,TX, Alberta)

500 um

- Enterite
- Epatite
- Miocardite
- Sindrome di malassorbimento

Isolamento del virus dal cuore e dall'articolazione

L'origine delle varianti è sconosciuta

500 um

E in Italia????

500 µm



500 µm



500 µm



500 µm

### Caso clinico

- Allevamento localizzato nel basso veronese
- Broiler di 46 giorni
- Aumento della mortalità 70 al giorno (18000)
- Sintomatologia nervosa in alcuni soggetti (8-9), movimenti ritmici del capo, perdita di equilibrio, alcuni con depressione del sensorio
- Sacrificati alcuni soggetti (5) e conferiti al laboratorio diagnostico aziendale

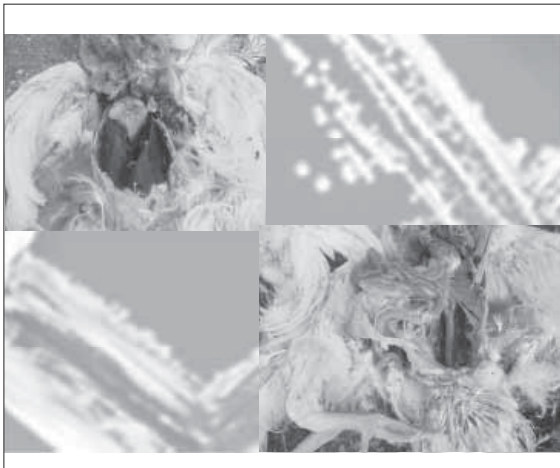
### Caso clinico

Sacrificati alcuni soggetti (5) e conferiti al laboratorio diagnostico aziendale

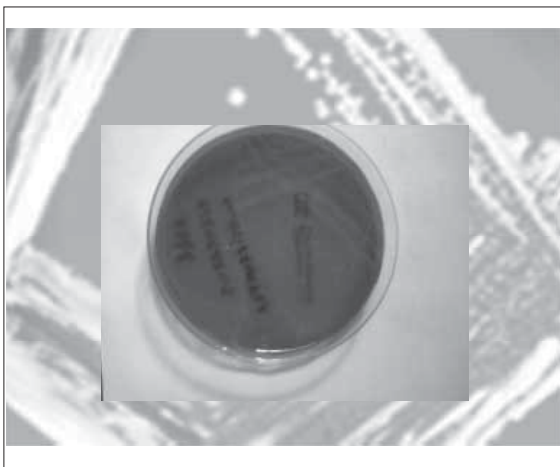
Accertamenti batteriologici da organi e cervello in soggetti con sintomatologia

Accertamenti virologici in RT-PCR per AI e ND

All'esame anatomico – patologico osservata epatomegalia, pericardite fibrinosa, aerosacculite addominale

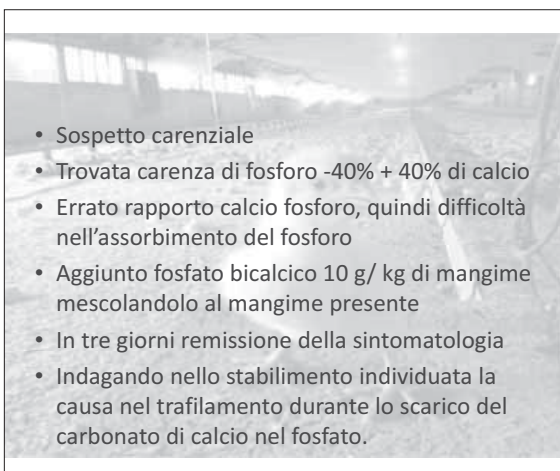


**Accertamenti virologici negativi**  
**Isolata riemerella anatipestifer dal cervello e dagli organi**  
**Sensibilità: ampicillina, amoxicillina, trimethoprim, enrofloxacin**



### Caso clinico

- Allevamento localizzato in Lombardia 65000 maschi e femmine
- Pulcini di 6 giorni di età
- Segnalata presenza di soggetti con difficoltà di deambulazione
- circa il 3% dei pulcini colpiti in particolare quelli più belli ed in carne, gli scarti non manifestavano sintomatologia



- Sospetto carenziale
- Trovata carenza di fosforo -40% + 40% di calcio
- Errato rapporto calcio fosforo, quindi difficoltà nell'assorbimento del fosforo
- Aggiunto fosfato bicalcico 10 g/ kg di mangime mescolandolo al mangime presente
- In tre giorni remissione della sintomatologia
- Indagando nello stabilimento individuata la causa nel trafileamento durante lo scarico del carbonato di calcio nel fosfato.

### Legge 181: benessere del pollo da carne

- Sono stati fatti circa 30 corsi (la maggioranza organizzati da Unaitalia) nelle varie regioni italiane (Trentino-Alto Adige, Lombardia, Piemonte, Veneto, Friuli, Emilia- Romagna, Marche, Puglia, Campania, Molise, Umbria). A breve Abruzzo
- Incontrati tutti gli allevatori di polli per il conseguimento del "certificato di formazione"
- Per gli allevatori in attività prima del giugno 2010 corso di 4 ore con due relazioni: una esplicativa della legge 181 (Centro di Referenza Benessere IZS BS) e una tecnica (Veterinari abilitati)

## Legge 181: benessere del pollo da carne

- Per gli allevatori in attività dopo il 2010 corso di 8 ore.
- Alla fine del corso esame a quiz con domande riguardanti la legge 181
- Da riproporre perché si ha la possibilità di discutere di tutte le problematiche che coinvolgono il mondo avicolo
- [www.formazione-avicoltura.it](http://www.formazione-avicoltura.it)

## Ringraziamenti

- **Paolo Fasoli**
- **Leandro Giusti**
- **Filippo Muccioli**
- **Emilio Morandini**
- **Raffaella Ceruti**
- **Ana Moreno**
- **Ferdinando Battistoni**

QUO  
VADIS







**ALESSANDRO SCOLARI**  
**Problemi sanitari in galline ovaiole**  
**in Italia**





## LIII CONVEGNO ANNUALE SIPA PROBLEMI SANITARI IN GALLINE OVAIOLE IN ITALIA

Alessandro Scolari

*Salsomaggiore, 8-9 2014*

### HANNO CONTRIBUITO:

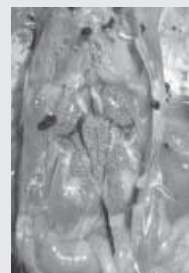
- UMBERTO BARALE
- EZIO BIANCHI
- ALDO DAOLIO
- MASSIMO GRAZIANI
- PAOLO GUARNERI
- PAOLO FIORINI
- PAOLA MASSI
- ALBERTO TRECCANI

### PROBLEMI SANITARI RISCONTRATI 2013 - 2014

- **MALATTIE VIRALI:** Bronchite infettiva, Pneumovirus, Influenza aviare, Enteriti virali.
- **MALATTIE BATTERICHE:** Micoplasmosi, Colibacillosi, Clostridiosi, Salmonellosi (piano salmonelle), Amiloidosi
- **MALATTIE PARASSITARIE:** Dermanyssus gallinae, Ascaridiosi, Coccidiosi
- **ALTRE PROBLEMATICHE:** Micotossicosi, Tecnopatie

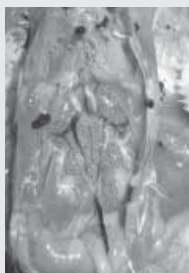
### BRONCHITE INFETTIVA

- E' ENDEMICA SOPRATTUTTO NELLE AREE AD ALTA DENSITA' DI ALLEVAMENTI E NEGLI ALLEVAMENTI MULTIETA'
- BEN CONTROLLATA CON LE VACCINAZIONI, RARAMENTE SI RISCONTRANO LIEVI CALI DI DEPOSIZIONE CON RIPERCUSSIONI SULLA QUALITA' DEL GUSCIO.
- 3 EPISODI DI NEFRITE NEFROSI IN POLLASTRE



### BRONCHITE INFETTIVA

- I GENOTIPI PREVALENTI IN ORDINE DECRESCENTE SONO:
- **QX like** (NON SEGNALATI EPISODI DI «FALSE LAYERS» - EPISODI DI NEFRITE IN POLLASTRE)
- **793/B**
- **Q1** (respiratorio/nefropatogeno, può causare proventriculite)
- **M41**
- **IT02**
- **GUANGDOND/XINDADI** - Sono segnalati 2 episodi con isolamento di questo genotipo nel Nord



### PNEUMOVIRUS

- PATOLOGIA IN CALO
- SEGNALATI ALCUNI CASI DI INFEZIONI IN DEPOSIZIONE, ASSOCIATE A LIEVI CALI DI PRODUZIONE DI UOVA.
- DECORSO INFLUENZATO DALLA QUALITA' DELL' AMBIENTE.
- DAI SENI INFRAORBITALI SI ISOLANO : E.COLI, ENTEROCOCCHI, STAFILOCOCCI,



## INFLUENZA AVIARE

- DA H7N7 AD ALTA PATOGENICITA' IN ROMAGNA
- 6 FOCOLAI : 3 IN OVAIOLE, 1 IN POLLASTRE, 1 IN TACCHINI DA CARNE ED 1 IN RURALI (952.658 SOGGETTI ABBATTUTI)
- ABBATTIMENTO PREVENTIVO E DEPOPOLAMENTO IN 12 AZIENDE (636.038 SOGGETTI.)
- PROVVEDIMENTI RESTRITTIVI MANTENUTI IN ALCUNE ZONE FINO ALL' 8/10/2013



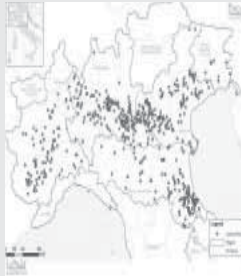
## INFLUENZA AVIARE

- PRESENZA DI FATTORI DI RISCHIO NELL' ALLEVAMENTO SEDE DEL PRIMO FOCOLAIO
- AZIENDE COINVOLTE AVEVANO MOLTEPLICI CONTATTI EPIDEMIOLOGICI IN AREE AD ALTO RISCHIO
- RAPIDA GESTIONE DELL' EMERGENZA DA PARTE DEL CENTRO DI REFERENZA, DELLE AUTORITA' SUL TERRITORIO E DELLE AZIENDE COINVOLTE
- MUTAZIONE DA BASSA AD ALTA PATOGENICITA' NELL' ALLEVAMENTO SEDE DEL PRIMO FOCOLAIO



## INFLUENZA AVIARE

- TERRITORIO AD ALTO RISCHIO DI I.A. PER LA PRESENZA DI ZONE UMIDE E L' ALTA DENSITA' DI ALLEVAMENTI.
- LA CAPACITA' DI REAZIONE DEL SISTEMA E LA ROBUSTEZZA DEI PIANI DI MONITORAGGIO HANNO FATTO PRONTAMENTE ACCETTARE ALLA U.E. LE MISURE DI CONTROLLO PROPOSTE DALL' ITALIA.
- DA ALLORA SONO STATI IDENTIFICATI 10 FOCOLAI ASINTOMATICI DA H5/H7 LP SOPRATTUTTO IN RURALI

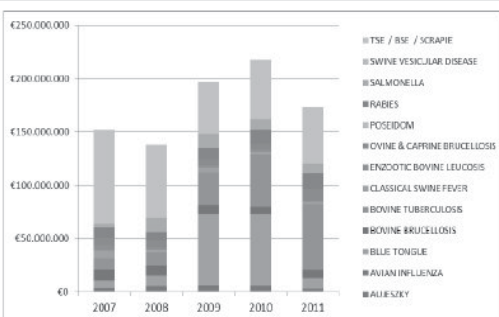


## INFLUENZA AVIARE

- DAL 1997 AL 2005 IL «VETERINARY FUND» HA SPESO PER IL RIMBORSO AGLI ALLEVATORI DEI DANNI DOVUTI AD EPIDEMIE CIRCA 10 MILIARDI DI EURO. (DG-SANCO)
- I COSTI MAGGIORI SONO DERIVATI DALLE EPIDEMIE DI BSE, AFTA EPIZOOTICA, PESTE SUINA CLASSICA, INFLUENZA AVIARIA, BLUE TONGUE ED ALTRE.
- QUESTO SISTEMA DI RIMBORSI NON HA FORNITO SUFFICIENTI INCENTIVI ALLA PREVENZIONE



## RIMBORSI PER EPIDEMIE DEGLI ANIMALI NELLA U.E. (DG-SANCO)



## ENTERITI VIRALI

- RIPORTATI EPISODI IN ALCUNI ALLEVAMENTI DI POLLASTRE NELLE PRIME SETTIMANE DI VITA.
- MALATTIA CHE TENDE A MANIFESTARSI ANCHE NEI CICLI SUCCESSIVI
- PRESENZA DI FECE NON DIGERITE
- COMPLICANZE BATTERICHE CON ISOLAMENTO DAL FEGATO DI E.COLI, ENTEROCOCCI.
- EVIDENTE DISINFORMITA'
- AGENTE (I) EZIOLOGICO RARAMENTE EVIDENZIATO



## VARIE

- **LARINGOTRACHEITE:** SEGNALATI POCHI EPISODI IN POLLASTRE CON ANDAMENTO BENIGNO. I SINTOMI POSSONO ESSERE PIU' GRAVI IN PRESENZA DI MYC. GALLISEPTICUM
- **MALATTIA DI GUMBORO :** BEN CONTROLLATA CON LE VACCINAZIONI IN INCUBATOIO.
- **MALATTIA DI MAREK:** ASSENTI LE NEOPLASIE IN DEPOSIZIONE. RIPORTATI DIVERSI EPISODI IN POLLASTRE DI NEUROPATIA PERIFERICA (CONSEQUENTE ALLA VACCINAZIONE), CON AUMENTO DELLA MORTALITA' DELLO 0,5 – 2%.

## PROBLEMI SANITARI RISCONTRATI 2013 - 2014

- **MALATTIE VIRALI:** Bronchite infettiva, Pneumovirus, Influenza aviare, Enteriti virali.
- **MALATTIE BATTERICHE:** Micoplasmosi, Colibacillosi, Clostridiosi, Salmonellosi (piano salmonelle), Amiloidosi
- **MALATTIE PARASSITARIE:** Dermanyssus gallinae, Ascaridiosi, Coccidiosi
- **ALTRE PROBLEMATICHE:** Micotossicosi, Tecnopatie

## COLIBACILLOSI

- COSTANTE PRESENZA
- PREVALENTI LE PERITONITI/OVARITI (VIA ASCENDENTE). SPESSO INFEZIONI CAUSATE DA PICA IN ALLEVAMENTI ALL' APERTO, IN VOLIERA, A TERRA.
- PRESENTI ANCHE LE LESIONI ALL' APPARATO RESPIRATORIO, COME COMPLICANZA DI INFEZIONI VIRALI, MICOPLASMOSI (DA MG) O COME CONSEGUENZA DI ERRORI NELLA GESTIONE DEL MICROCLIMA
- BUONI RISULTATI CON L'UTILIZZO DI UN VACCINO VIVO



## MICOPLASMOSI

- **MG:** ALCUNI CASI IN ALLEVAMENTI MULTIETA' CON PRESENZA DI COLIBACILLOSI E PEGGIORAMENTO DELLA QUALITA' DEL GUSCIO.
- **MS:** PROBLEMI ALL' APICE DEL GUSCIO IN DIMINUZIONE. 2 CASI DI INFEZIONE DA MS ALL' INIZIO DELLA DEPOSIZIONE CON CONSEGUENTE GRAVE COLIBACILLOSI
- E' IMPORTANTE IL RUOLO DEI VACCINI VIVI NELLA PREVENZIONE DI QUESTE PATOLOGIE.



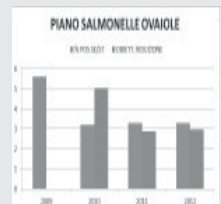
## ENTERITI

- SEGNALATE IN AUMENTO
- DI TIPO CATARRALE, NECROTICO, NECROTICO EMORRAGICO, MUCOIDE.
- ISOLAMENTO DI CL.PERFRINGENS, CL. SORDELLI, CL. BUTYRICUM, BRACHYSPIRA SPP.
- FREQUENTEMENTE RILEVATO UN AUMENTO ABNORME DELLE ENTEROBACTERIACEE.
- IN DIVERSI CASI LA PATOLOGIA SI E' PROTRATTA A LUNGO E GLI INTERVENTI CON DIVERSE TIPOLOGIE DI FARMACI/ COADIUVANTI NON HANNO RISOLTO I PROBLEMI. IN UN CASO SI E' VERIFICATO UN MIGLIORAMENTO CON L' USO DI OLI ESSENZIALI
- IN UN CASO, RISCONTRATA ALTA CONCENTRAZIONE DI Mg (10%) NEL CARBONATO DI CALCIO.



## SALMONELLE

- S.GALLINARUM: PRESENTE ED IN LEGGERO AUMENTO.
- PIANO NAZ. SALMONELLE: S. ENTERITIDIS/TYPHIMURIUM RISCONTRATE NEL 3% CIRCA DEI GRUPPI CONTROLLATI.
- I GRUPPI ACCASATI IN ALLEVAMENTI MULTIETA' SONO MAGGIORMENTE A RISCHIO DI INFEZIONE.
- LA VACCINAZIONE CON VACCINI VIVI AIUTA A CONTENERE LE REINFEZIONI



## AMILOIDOSI

- E' RIPORTATA LA PRESENZA SPORADICA DI ARTROPATIA AMILOIDE IN POLLASTRE.
- DI NORMA BASSA PREVALENZA NEI GRUPPI COLPITI .
- ISOLAMENTO DI *Enterococcus faecium* DALLE ARTICOLAZIONI



W.Landman, GD Deventer

## PROBLEMI SANITARI RISCONTRATI 2013 - 2014

- **MALATTIE VIRALI:** Bronchite infettiva, Pneumovirus, Influenza aviare, Enteriti virali.
- **MALATTIE BATTERICHE:** Micoplasmosi, Colibacillosi, Clostridiosi, Salmonellosi (piano salmonelle)
- **MALATTIE PARASSITARIE:** Dermanyssus gallinae, Ascaridiosi, Coccidiosi
- **ALTRE PROBLEMATICHE:** Micotossicosi, Tecnopatie, Varie

## DERMANYSSUS GALLINAE

- IN AUMENTO: GRAVI INFESTAZIONI ANCHE NEI NUOVI ALLEVAMENTI CON GABBIE ARRICCHITE.
- LE STRUTTURE DI ARRICCHIMENTO IN MATERIALE PLASTICO FAVORISCONO L'ANNIDAMENTO E LA PROLIFERAZIONE DEGLI ACARI.
- LA CAPACITA' DELL'ALLEVATORE DI INDIVIDUARE TEMPESTIVAMENTE L'INFESTAZIONE E DI EFFETTUARE IL TRATTAMENTO NEI PUNTI DI MAGGIOR CONCENTRAZIONE DEL PARASSITA LIMITA I DANNI ECONOMICI



## ALTRE PARASSITOSI

- **ASCARIDIOSI:** PRESENTE FREQUENTEMENTE NEGLI ALLEVAMENTI A TERRA ED IN VOLIERA.
- **CESTODI (TENIE), TRICHOSTRONGYLUS TENUIS:** IN ALLEVAMENTI BIOLOGICI E ALL'APERTO
- **COCCIDIOSI:** DA E.TENELLA NELLE PRIME SETTIMANE DOPO L'ACCASAMENTO NELLE NUOVE GABBIE ARRICCHITE (CONTATTO DEGLI ANIMALI CON LE FECI).
- **PIDOCCHIO POLLINO:** SEGNALATI 2 CASI

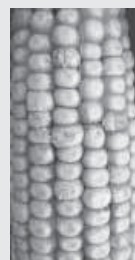


## PROBLEMI SANITARI RISCONTRATI 2013 - 2014

- **MALATTIE VIRALI:** Bronchite infettiva, Pneumovirus, Influenza aviare, Enteriti virali.
- **MALATTIE BATTERICHE:** Micoplasmosi, Colibacillosi, Clostridiosi, Salmonellosi (piano salmonelle), Amiloidosi
- **MALATTIE PARASSITARIE:** Dermanyssus gallinae, Ascaridiosi, Coccidiosi
- **ALTRE PROBLEMATICHE:** Micotossicosi, Tecnopatie, Varie

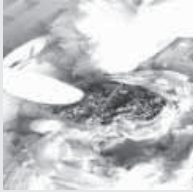
## MICOTOSSICOSI

- CON UNA CERTA FREQUENZA SI RISCONTRANO NEI MANGIMI CONCENTRAZIONI MAGGIORI DI ALCUNE MICOTOSSINE RISPETTO AGLI ANNI SCORSI
- FUMONISINA: 3-7 ppm;
- DON: 1,5 - 5 ppm
- T2
- SINTOMI IN ALLEVAMENTO (NON SEMPRE PRESENTI): SCARSO APPETITO, LIEVE DIMINUIZIONE DELLA PRODUZIONE DI UOVA, SBIANCAMENTO DEL GUSCIO
- LESIONI: GASTRITI/ULCERE AGLI STOMACI (CON MELENA). ENTERITE CON FECI LIQUIDE, AUMENTO MORTALITA'

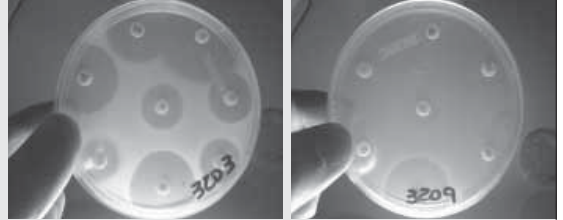


## TECNOPATIE

- **PICA, CANNIBALISMO:** IN VOLIERE, ALLEVAMENTI A TERRA ED ALLEVAMENTI ALL'APERTO.
- **DEBECCAGGIO ECCESSIVO :** CON TECNICA LASER IN PULCINI FIGLI DI RIPRODUTTORI GIOVANI. SE IL DEBECCAGGIO E' INSUFFICIENTE C'E' IL RISCHIO DI AUMENTO DEGLI EPISODI CANNIBALISMO.
- AUMENTO DELLA MORTALITA' PER **PERITONITI** DOVUTE ALL'INGESTIONE DI CHIODI, FILI DI FERRO, VITI ED ALTRO MATERIALE UTILIZZATO PER L'INSTALLAZIONE DELLE NUOVE ATTREZZATURE NEI CAPANNONI.



## ANTIMICROBICI



GRAZIE PER L'ATTENZIONE







**STEFANO SERAFINO**  
**Patologie del tacchino da carne**



SOCIETÀ ITALIANA  
DI PATOLOGIA AVIARE  
SEZIONE ITALIANA  
DELLA WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

### LIII CONVEGNO ANNUALE SIPA



Salsomaggiore Terme (PR)  
PALAZZO DEI CONGRESSI  
8 - 9 MAGGIO 2014

## PATOLOGIE DEL TACCHINO DA CARNE

### ANNATA COMPLICATA

#### Principali problemi:

- **INFLUENZA AVIARE**
- **MICOPLASMOSE**
- **ORT**
- **RIEMERELLA ANATIPESTIFER**

### INFLUENZA AVIARE

#### Caratteristiche:

- famiglia **Orthomyxoviridae**
- virus a **RNA**, con **Envelope**

**Dicembre 2012**

**AIV SOTTOTIPO H9**

**INDEX CASE:** prima positività  
in azienda di tacchini da  
carne nel comune di  
Bovolone



Gli animali presentavano:

- lievi sintomi respiratori,
- riluttanza al movimento,
- mortalità superiore alla norma

I primi test specifici per Influenza  
evidenziavano positività per AIV,  
negatività per H5 e H7, **H9 positivi**

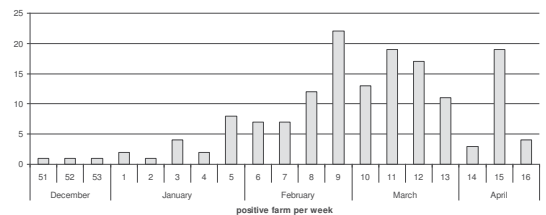
### L'epidemia

Dopo la prima positività altre aziende di tacchini da carne hanno iniziato a mostrare sintomi analoghi e sono risultati positivi per AIV sottotipo H9

La diffusione dell'infezione è stata rapidissima, dalla fine 2012 ad aprile 2013 sono stati registrati 154 focolai in Veneto

Aziende presenti	Aziende positive (%)
466	154 (33%)

weekly distribution of positive case



### SEGNI CLINICI OSSERVATI:

- Infezione tardiva (dopo i 60-70 gg di età)
- Mortalità giornaliera intorno allo 0,5%
- Mortalità più alta solo in caso di infezioni concomitanti

### STRATEGIA DI INTERVENTO

Al fine di ridurre l'impatto dell'infezione in campo si è deciso di utilizzare la vaccinazione specifica per il ceppo H9

Il CRN ha testato l'efficacia di tre prodotti commerciali

### VACCINAZIONE IN CAMPO

Iniziata il primo maggio in circa 150 aziende

**Protocollo:** a 30-40 gg, poi booster 1 mese dopo

**Monitoraggi:** sentinelle e valutazione efficacia

In concomitanza con l'introduzione della vaccinazione nessun focolaio è stato più registrato da maggio 2013

**Rapida estinzione dell'epidemia:**

- popolazione immunizzata **NATURALMENTE** ed **ARTIFICIALMENTE**
- **BIOSICUREZZE** (Aspetto culturale e formativo degli allevatori)

### Da segnalare:

**Agosto 2013:** 1 caso H7 in Emilia Romagna

Prima positività riscontrata in un allevamento di galline (Ostellato – Fe)

**POI**

Positività in 18000 tacchini femmine (Portomaggiore – Fe)

### MICOPLASMOSI

#### MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

- Riduzione delle positività rispetto al 2012
  - Morbilità elevata, mortalità modesta ad eccezione delle forme complicate da E. coli
  - Sintomi osservati: rantoli umidi, tosse persistente, scolo nasale, modesta sinusite dei seni infraorbitali
  - Terapia d'elezione: **DOXICICLINA**

## MYCOPLASMA SYNOVIAE

2013: prevalenza rispetto a MG

- **Malattia contagiosa sistemica che coinvolge membrane sinoviali e produce artrosinoviti e bursiti**
- **Sintomi:** - *forma respiratoria* simile a MG,  
- *forma articolare* con gonfiore ed edema
- **Ceppi coinvolti:** > D, < F e comparsa dell'H
- **Terapia d'elezione:** DOXICICLINA e TILOSINA

## ORT: ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE

- Gram negativo
- Aumento dei casi con comparsa già nelle prime settimane
- **Forma Respiratoria:** scolo nasale, dispnea, starnuti, tosse produttiva con possibili tracce di sangue (POLMONITE PURULENTA)
- **Forma Articolare:** zoppie e gonfiori
- **Lesioni:** aereosacculite, polmonite sierofibrinosa

## RIEMERELLA ANATIPESTIFER

- Gram -, famiglia Flavobacteriaceae
- Malattia ciclica. Aumento dei casi durante il 2013
- Il tacchino ammalato a 60-70 gg. Improvvisa mortalità, depressione del sensorio. Paresi e paralisi delle ali e delle zampe, ribaltamento laterale, incoordinamento della testa
- Mortalità variabile. Tende a recidivare
- **Lesioni:** essudato fibrino-gelatinoso in cavità, pericardite, aereosacculite, periepatiti, milza pallida e ipoplastica e meningite fibrinosa

### Prima di concludere:

Visto anche le pressioni e richieste in materia di ab resistenza si sta cercando di semplificare la procedura di registrazione di un vaccino vivo per HEV

A tal proposito da gennaio 2014:

VALUTAZIONE EPIDEMIOLOGICA CIRCOLAZIONE VIRUS HE NEGLI ALLEVAMENTI DI TACCHINI DA CARNE

### Studio prevede:

- 2 gruppi di animali (vaccinati e non vaccinati)
  - prelievi nelle diverse età

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**

**Grazie Veniero**









**MORANDINI, BANO, BURZONI,  
GIOVANARDI, GRILLI, MARIN,  
MOTTA, PANDOLFO,  
RAGAZZINI, SCOLARI**

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

## LIII CONVEGNO ANNUALE SIPA

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

Morandini – Bano – Burzoni – Giovanardi – Grilli – Marin - Motta – Pandolfo - Ragazzini - Scolari

Salsomaggiore 2014



## Produzione

- Prodotti di alta qualità
- Produzioni diffusa sul territorio
- Allevamenti : 700 circa (dati UNAITALIA)
- Faraone
- Capponi – galletti
- Anatre e oche
- Selvaggina : fagiani - starni – quaglie – pernici rosse



## Faraona

### Enterite

- Polifattoriale (virus, batteri, coccidi, flagellati, management)
- Enterite catarrale
- Assottigliamento parete intestinale
- Periodo invernale (nov-mar)
- Prime settimane di vita



## Faraona

### Enterite

- Astrovirus (in genere tipo 2)
- Rotavirus
- Coccidi
- Batteri : in genere clostridi
- Polifattoriale
- Osservati pochi problemi
- Clima invernale particolarmente mite



## Faraona

### Candidiasi : *Candida albicans*

- Frequente dopo gravi forme di enterite
- Dopo ripetuti trattamenti con Ab
- La minor incidenza delle forme enteriche ha portato di conseguenza ad avere meno problemi



## Faraona

### Colisetticemie

- Osservate in particolare nelle prime settimane di vita
- Onfaliti - Coligranulomatosi
- Meno frequenti le colisetticemie dopo la V sett. di vita
- Situazione migliore rispetto al 2012



## Faraona

### R. anatispestifer

- Sintomi nervosi
- Serosite fibrinosa
- Meningite fibrinosa
- Essudato nasale mucopurulento
- Si osserva sporadicamente



## Faraona

### C. botulinum

- Forma nervosa : paralisi flaccida
- Mortalità
- Terapia non sempre ha successo
- Voliera
- Osservata principalmente negli allevamenti rurali



## Faraona

### Caso clinico

- Riproduttori
- Trasferite 3 settimane prima
- Calo di deposizione
- Mortalità non elevata ma costante
- Soggetti cachettici e disidratati



## Faraona

### Caso clinico

#### Necropsia

- Epatomegalia
- Splenomegalia
- Ulcere stomaco muscolare

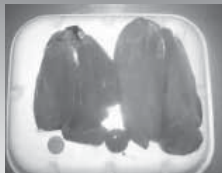


## Faraona

### Caso clinico

#### Esame batteriologico

- Fegato : negativo
- Milza : negativo



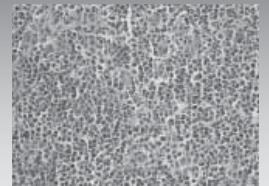
## Faraona

### Caso clinico

#### Esame istopatologico

- Infiltrazione diffusa di cellule linfoidi
- Ancora visibili in alcuni punti gli epatociti

Microscopia elettronica  
negativo



## Faraona

### IPOTESI

L'evoluzione del caso clinico farebbe pensare ad una forma virale

Da non escludere una infezione accidentale con un virus eterologo

Marek ?

Reticoloendoteliosi ?



## Faraona

### Pancreatite virale

- Malattia virale sostenuta da Adenovirus del gruppo 1
- Trasmissione verticale
- Animali giovani (2-4 sett)
- Trasferimento pollastre in ambiente infetto
- Rispetto al passato si osserva molto raramente



## Faraona

### Coccidiosi

*Eimerie Principali*

- *E. numidae* (intestinale)
- *E. grenieri* (cecale)
- Ben controllata attraverso la prevenzione con trattamenti idonei



## Anatra

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



## Anatra

### Parvovirosi

- Non osservata
- La corretta applicazione della vaccinazione si è dimostrata efficace nel controllare questa forma virale



## Anatra

### *R. anatipestifer*

- Osservata in particolare in allevamenti di piccole unità
- Meno frequente che in passato
- Sempre più rara negli allevamenti industriali



## Anatra

### *P. multocida*

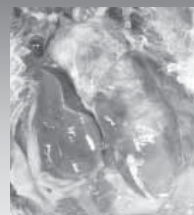
- Mortalità improvvisa
- Osservata occasionalmente negli industriali
- Presente ancora negli allevamenti rurali con una certa frequenza
- Miglioramento delle misure igieniche e delle biosicurezze



## Anatra

### *E. coli*

- pericardite
- aerosacculite
- splenomegalia
- epatomegalia
- osservata nelle prime settimane



## Anatra

### *Streptococcus*

- Ancora presente con incidenza inferiore rispetto al passato
- Prime settimane
- Problemi respiratori di natura virale 20, 30 gg



## Galletto

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



## Cappone

- Problemi legati all'intervento chirurgico
- Enteriti
- Coccidiosi
- Patologie respiratori



## Cappone

- Problemi di colorazione anomala
- Osservati al macello
- In genere dopo problemi enterici
- Coccidiosi





## Capponi

### *M. synoviae*

artrosinoviti

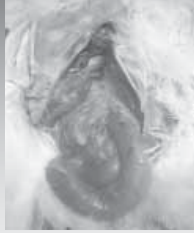
borse sternali

problemi di pigmentazione

### *C. perfringens*

Enterite necrotica

Vaccinati per coccidiosi



## Selvaggina

- diffusa sul territorio del nord Italia
- allevamenti in genere di piccole dimensioni
- riproduzione e ingrasso
- produzione stagionale
- riproduttori in gabbia
- accrescimento a terra
- ripopolamento e caccia



## Fagiano

### *C. Botulinum*

- paralisi flaccida
- 8-20 w mortalità elevata
- Estate (lotta alle mosche, asportazione dei morti)
- Frequente nei fagiani in voliere con fitta vegetazione
- Casi osservati anche nelle quaglie per la difficoltà a togliere gli animali morti



## Fagiano

### Coccidiosi

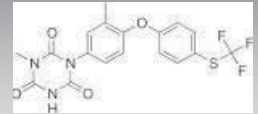
#### *E.colicchi & Ephasiani*

3-5 settimana

Aumento della mortalità

Mangime con lasalocid (90ppm)

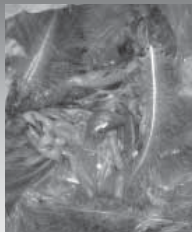
Efficace trattamento con toltrazuril



## Fagiano

### Marble spleen disease

- Adenovirus tipo 2
- Mortalità
- Milza ingrossata associata ad edema polmonare emorragico
- Saltuariamente (sett-ott)
- Età adulta
- Esame necroscopico : milza molto dura e marmorizzata



## Fagiano

### Malattia linfoproliferativa

Retrovirus

Riproduttori a fine carriera

Epatosplenomegalia

Cachessia

Mortalità bassa persistente



## Quaglia

- **Enteriti virali 2-3 sett**  
(soprattutto nelle quaglie da lancio, allevate a terra e dopo cicli ripetuti)
- **Coccidi**
- **Problemi respiratori** : stagione fredda
- **Tetratrichomonas**
- **Mg** : qualche caso, osservate positività anche in fagiani (ruolo della selvaggina come possibile reservoir)



## Starna

### Seni gonfi

P. gallinarum & E. coli e altri batteri, virus e micoplasmi

Età : oltre i 60 gg problema per la vendita

Vaccino : past mult e nd

**Pseudomonas spp.**

8-15 gg

Setticemia, isolamento

Mortalità 10%



## Starna

### Diftero vaiolo

- Vaccinazione
- Animali non vaccinati
- Snusite
- Presenza di lesioni difteriche
- Tarda estate autunno (zanzare)



## Starna

### Capillariosi dell'ingluvie

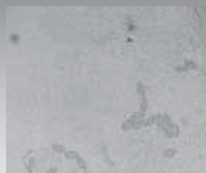
- Molto frequente nella fase di voliera
- Mucosa del gozzo e dello stomaco
- Ipsessimento
- Infiammazione
- Difficoltà a deglutire dimagrimento
- Atteggiamento a "pinguino"



## Starna

### Capillariosi dell'ingluvie

- Sintomi clinici
- Esame necroscopico
- Esame microscopico
- Può essere associata a micosi



## Starna

### Gozzo pendulo

90 120 gg adulti

Eziologia ?

Meno frequente rispetto al 2012



## Pernice rossa

### *Enteriti*

Virali tra la 2-4 sett

Enterite necrotica : *C. perfringens*

### *Verminosi*

Ascaridi, l'intestino si presenta sfiancato con un ammasso di vermi

Capillaria nel gozzo



## Pernice rossa

### *Protozoi flagellati*

trichomonas 30-90 gg

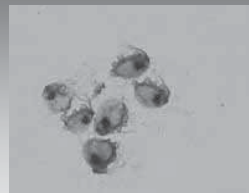
### *Eimerie*

Coccidiosi : dai 30 gg

### *Ornithobacterium*

In animali morti : necrosi ossa del cranio

### *Problemi respiratori*



## Oca

### *Setticemie*

- E. coli
- Oltre i 30 gg
- mortalità



## Grazie per l'attenzione

Emilio.Morandini@veronesi.it









## **CONVEGNO**

**Strategie alternative o complementari  
all'uso degli antimicrobici in avicoltura**



**FRANCO CALINI**  
**Alimentazione e salute intestinale**

## Alimentazione e salute intestinale

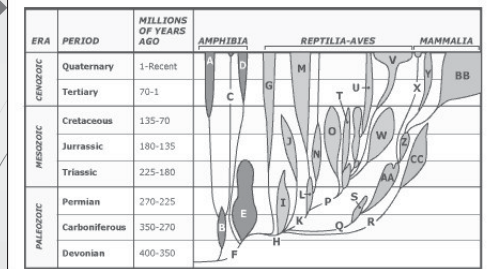
Franco Calini, Consulente per l'Industria Zootecnica e dell'Alimentazione Animale

### Salute intestinale

- È un concetto un po' astratto
- È una generalizzazione
- Esiste una salute intestinale se non specificiamo di chi è l'intestino?
- Se non specificiamo, di fatto, significa assenza di problemi
- ...sembra un po' poco...
- Si finisce quasi sempre a parlare di prodotti per la salute intestinale...
- Proviamo, per una volta, a partire dalla testa del problema e non dalla coda

### Partiamo dal principio

- L'avicoltura è l'allevamento degli UCCELLI
- Abbiamo ben presente cosa sono?
- ...parlando coi nutrizionisti, a volte sembra che l'unica differenza rispetto ai suini siano le penne e le dimensioni...



### Uccelli: Strategie e volitive

- Classe di vertebrati tetrapodi che vivono in quasi tutti gli ecosistemi, dall'Artide all'Antartide.
- Gli uccelli sono animali bipedi, alati, omeotermi ed ovipari, specializzati nel volo. Le loro dimensioni variano dai 5 cm del piccolo e leggero colibrì di Elena ai 2,7 m dello struzzo, un uccello africano in adatto al volo.
- Tutti gli uccelli hanno i due arti anteriori modificati in ali e questa caratteristica permette di volare a quasi tutti gli appartenenti alla classe.
- Proprio questa capacità di volare ha portato all'evoluzione di particolari adattamenti anatomici, tra i quali si possono citare il sistema respiratorio, il sistema digestivo, ed anche il sistema emuntore.

### Meilusuga helenae



1,9 g e 5 cm

### Struthio camelus



>150kg e 2,70 m

## Cosa serve per volare ?

Adattamenti del sistema respiratorio degli uccelli

### ■ Estremamente complesso

- Sacchi aerei anteriori – intervertebrali, cervicali e toracici
- Polmoni
- Sacchi aerei posteriori – toracici e addominali

## Isacchi aerei

- Isacchi aerei si espandono durante l'inalazione e sono strutture che possiamo trovare soltanto nei volatili. Non hanno un ruolo diretto nello scambio gassoso con l'esterno, ma immagazzinano l'aria e si comportano come manicci, permettendo ai polmoni di mantenere un volume costante, grazie all'aria fresca che costantemente arriva dai sacchi.
- L'aria, durante l'inspirazione, entra all'interno del corpo dell'animale attraverso le naresi passando poi nella trachea. Il 75% super i polmoni, senza entrarvi, e viene incanalata direttamente nei sacchi d'aria, che si estendono dai polmoni si connettono con le cavità ossee, che vengono quindi riempite di gas. Il restante 25% di aria inalata, viene invece indirizzata direttamente nei polmoni.
- Durante l'espirazione, invece, l'aria utilizza fuoriesce dai polmoni mentre quella inutilizzata passa dai sacchi aerei ai polmoni. Quindi, durante entrambe le fasi della respirazione i polmoni di un uccello ricevono costantemente aria fresca. Il fatto di fondamentalmente importanza in un'attività dispendiosa come il volo. Dal momento che gli uccelli hanno un'alta richiesta metabolica, davanti dal volo, il loro organismo ha una grandissima domanda di ossigeno.

## Respirazione negli uccelli

- A differenza dei polmoni dei mammiferi, quelli degli uccelli non hanno alveoli, ma contengono milioni di piccoli passaggi, chiamati rambronchi, connessi l'uno con l'altro dai dorsobronchi e dai ventrobronchi.
- L'aria fluisce attraverso le pareti dei rambronchi, che hanno la stessa struttura tipica degli alveoli, perfino poine le vescicole d'aria, chiamate aria, che si proiettano direttamente dai rambronchi stessi.
- Dalle atri si sviluppano i capillari d'aria, dove l'ossigeno e il biossido di carbonio sono scambiati per diffusione, passando nei capillari che trasportano il sangue.
- Gli uccelli non hanno un diaframma e perciò l'intera cavità del corpo funziona come un unico mantice, per muovere l'aria attraverso i polmoni. Per questo motivo, la respirazione richiede la contrazione muscolare.

## riflettiamolo ...

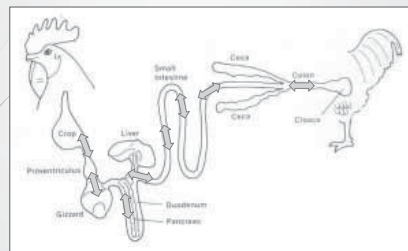
- negli uccelli gli adattamenti al volo del sistema respiratorio sono imponenti...
- ...perché pensare che invece quelli del sistema digestivo non lo siano ?
- ...come mai nella pratica si continua a pensare agli uccelli come «MONOGASTRICI», come se fossero suini ?

## Cosa serve per volare ?

Adattamenti del sistema digerente degli uccelli

- Frugivori, carnivori, onnivori, e erbivori
- Metabolismo molto elevato
- Necessità di risparmiare peso
- Dimensioni ridotte (5/6 kg tra il più grande ed il più piccolo, 4 kg nei volatori, 7/8 kg nei mammiferi terrestri, - pipistrelli 2g-1,8kg, 3/4 kg)
- Riduzione delle dimensioni del digerente
  - Riduzione della superficie assorbitiva
- Come non perdere efficienza digestiva ?

## Uno dei modi: la retroperistalsi

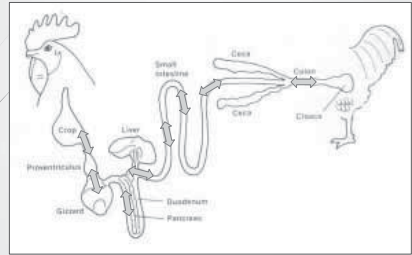




## Problemi associati alla retroperistalsi

- Imammiferi hanno – e non tutti – limitate sempre di retroperistalsi fisiologica
  - uomo:
    - duodeno prossimale, protezione contro acidità gastrica
    - ileo distale, recupero elettroliti
  - equidi a livello ceco-colicco - ma non vomitano
  - ruminanti: reiezione del bolo mericio
- Valvola ileo-cecale

## Retroperistalsi



## L'intestino è una frontiera ben presidiate (Klaing, 2005)



## La motilità intestinale

- Compensa la ridotta lunghezza dell'intestino (i.e. superficie)
- Espone le ingesta alle secrezioni gastriche
- Mescola vigorosamente le stesse con gli enzimi digestivi
- Favorisce la digestione e l'assorbimento dei nutrienti
- **Scompeggia la proliferazione microbica**
- Macinazione fine ed eccesso di trattamenti termomeccanici favoriscono l'insorgere di problemi intestinali
- La incompleta digestione nell'intestino anteriore favorisce la crescita delle popolazioni batteriche in ceco e colon - disbatteriosi (Bedford 2002)

## Sintomi di scadente motilità intestinale

- Proventricolite e atrofia del ventricolo
- Consumo di penne e lettiera
- Scarsa digestione di proteine e grassi (peggiore della conversione, presenza mangime indigerito nelle feci)
- Aumentata suscettibilità alla colonizzazione da parte dei patogeni
- Scarso riassorbimento di acqua ed elettroliti
- Aumento della mortalità



▶ I patogeni conosciuti sono solo una parte del problema della salute intestinale

- ▶ Un pollo di 1 kg ingerisce circa 15 g di antigeni algamo e possiede circa 15 g di antigeni associati alla microflora commensale
- ▶ Il sistema immunitario ha la capacità di rilevare antigeni a livello di  $ng/ml - 10^{-9} g/ml$
- ▶ Gli antigeni dei patogeni sono il vero «ago nel pagliaio»

## Microbiota

- ▶ Microbiota luminale
- ▶ Microbiota associato al mucoso
- ▶ Microbiota epiteliale

## Microbiota luminale

- ▶ In buona parte ignorato dal sistema immunitario,
- ▶ Non attiva risposta infiammatoria o cellulare a meno che rilasci tossine che penetrano nello strato di mucoso, in questo caso evocano una risposta da parte delle IgA secretorie

## Microbiota associato al mucoso

- ▶ Specializzato nell'uso del mucoso come alimento/substrato, è una flora positiva, occupa siti che potrebbero essere occupati da patogeni (esclusione competitiva), forse fornisce principi nutritivi all'ospite

## Microbiota epiteliale

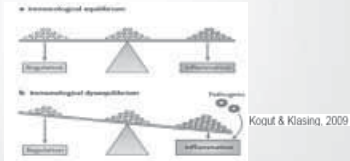
- ▶ Attaccato al glicocalice o alle membrane apicali, può formare un biofilm
- ▶ Alcuni tipi di batteri possono vivere in associazione con l'ospite portando benefici diretti (nutrienti) e indiretti (esclusione di patogeni) – l'epitelio può secernere nutrienti per favorire l'attaccamento –
- ▶ Alcuni tipi però sono in grado a volte di invadere le cellule e attivare una risposta immunitaria – sempre costosa, non sempre malata

## Relazioni microbiota-ospite

- ▶ **Commensalità**
  - ▶ è un'interazione non obbligatoria fra due esseri viventi in cui uno approfitta del nutrimento o degli scarti dell'altro senza procurare sofferenza o disturbo. Un organismo trae benefici dall'altro e l'altro non è né danneggiato né aiutato.
- ▶ **Mutualismo**
  - ▶ è un'interazione non obbligatoria fra due esseri viventi dalla quale entrambi traggono beneficio
- ▶ **Patogenicità**
  - ▶ è un'interazione non obbligatoria fra due esseri viventi nella quale uno dei due riceve danno

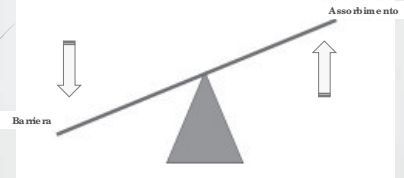
## Nutrizione e immunità sono collegate

- quasi tutti i principi nutritivi hanno un ruolo fondamentale nel sostenere la funzione immunitaria
- l'eccesso o la carenza possono avere effetti rilevanti sullo status immunitario e sulla suscettibilità ai patogeni
- È estremamente importante mantenere la capacità immunitaria senza attivare processi infiammatori



## Integrità intestinale

Equilibrio tra funzione assorbitiva e funzione di barriera, inversamente correlate



## Integrità intestinale

Equilibrio tra funzione assorbitiva e funzione di barriera, inversamente correlate

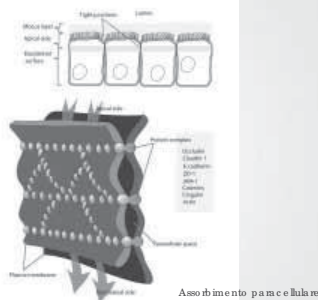


## Integrità Intestinale

- «Cellule e prodotti che costituiscono barriera contro le perdite o la traslocazione di componenti alimentari, tossine microbiche e microrganismi dal lume all'interno dell'organismo»

*Jeunissen et al., 2002*

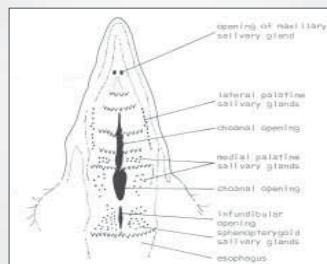
## Tight junction



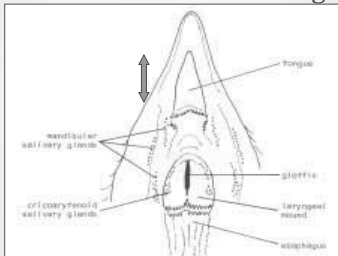
## Anatomia della deglutizione

- Niente denti, niente masticazione
- Saliva collososa, non acquosa
- Non c'è palato molle ma oro faringe
- Lingua spessa, che si raddrizza, non protrusibile
- La lingua può solo eseguire movimenti rostro-caudali, non latero-laterali
- No deglutizione se la testa è bassa

## Palato



## Pa pavimento dell'oro faringe



## Deglutizione

- Il becco afferra la particella
- Si chiudono le coane
- La lingua spinge la particella contro il palato
- La saliva collososa trattiene il bolo
- Rapidi movimenti rostro-caudali della lingua fanno rotolare il bolo in faringe, con l'aiuto delle papille della lingua e del palato
- Si chiudono le fessure e aperture infundibolari
- Movimenti rostro-caudali del tumulo, aiutati dalle sue papille diette caudalmente, con l'aiuto della saliva collososa, rastrellano il cibo verso l'esofago.

## Perchè la granulometria è importante

- La dimensione del becco varia con l'età
- Tendono a preferire particelle che si adattano alle dimensioni del becco
  - Attenzione alla selezione !!
- Le polveri si impastano con la saliva
  - Mangime perso, abbeverato sporchi, aumento del consumo d'acqua

## Mais fine in diete in farina

Griglia (mm)	d <sub>gw</sub> (mm)	Energia (kWh/t)	EE <sub>f</sub> (t/h)	EMAn kcal/kg
2.5	0.510	10.3	0.822	3175
3.5	0.687	7.4	0.984	3168
4.5	0.811	5.9	1.395	3218
10.0	1.080	4.0	2.000	3197

Zanotto DL, Guidoni AL, Abbino LF, de Bem PAR, Fahlke FB  
CT218/EMBRAPA-CNPSA, December 1996, p.1-2

**Granulometria do Milho em Rações de Crescimento de Frangos de Corte e seu Efeito no Desempenho e Metabolismo**  
Corn Particle Size on Broiler Grower Diets and its Effect on Performance and Metabolism

Artigo Original

171

**Mais fine in diet e in farina**

dgw	0.337	0.574	0.680	0.778	0.868	0.936
S <sub>gw</sub>	1.9	2.0	2.2	2.3	2.4	2.4
ADFI (g)	3119 b	<b>3167</b> a b	<b>3179</b> a b	3302 a	3312 a	<b>3227</b> a b
ADG (g)	1413 b	<b>1510</b> a b	<b>1543</b> a b	1569 a	1641 a	1566 a
FCR	2.210 a	<b>2.100</b> a b	<b>2.107</b> a b	<b>2.106</b> a b	2.018 b	<b>2.061</b> b
Ventriço (g)	26 d	<b>36</b> b c	<b>35</b> c	<b>40</b> a b	42 a	43 a

Ribeiro AMI, Magalhães N, Penz Jr AM.  
Revista Brasileira de Ciência Avícola, Jan-Abr 2002; v.4 / n.1 / 047 - 053

**Tabela 2** – Peso (PC) e rendimento de carcaça (RC), peso (PP) e rendimento de peito (RP), peso e rendimento de coxa/perna (PCR) e peso e rendimento do gorgura abdominal (GAB, RGAB) de frangos aos 42 dias de idade alimentados com dietas de diferentes granulometrias (DGM) (Experimento 1).

DGM (mm)	PC (g)*	RC (%)	PP (g)	RP** (%)	PC/P (g)	RC/P (%)	GAB (g)	RGAB (%)
0.337	1808b	83.81b	457 b	24.0	470b	25.1	47	2.51
0.574	1909ab	84.39b	466ab	25.0	513c	26.2	45	2.29
0.680	1923a	84.93a	494ab	25.0	496ab	25.2	48	2.43
0.778	1926a	85.01a	484ab	24.3	501ab	25.3	49	2.49
0.868	1967a	85.15a	506a	25.0	509ab	25.2	49	2.43
0.936	1923a	84.83a	476ab	24.0	515a	26.0	48	2.44
Prob.	0.0019	0.0014	0.0198	NS	0.0131	NS	NS	NS
C.V. (%)	4.6	1.1	7.0	5.3	6.6	6.2	25.1	25.5

Medias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.  
\* Peso de carcaça inclui cabeça e pes.  
\*\* Rendimento da parte: peso da parte/peso da carcaça.

**Tabela 4** – Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte aos 42 dias de idade em função da granulometria da dieta (DGM) (Experimento 2).

DGM (mm)	CR (g)	GP (g)	CA (g/g)
0.337	2970 b	1303 b	2.28 a
0.574	3148 a	1458 a	2.16 ab
0.680	3154 a	1493 a	2.11 b
0.778	3199 a	1457 a	2.19 ab
0.868	3198 a	1533 a	2.09 b
0.936	3151 a	1483 a	2.12 ab
Probabilidade	0.0001	0.0001	0.0159
C.V. (%)	2.36	4.54	4.19

Medias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.  
Efeito quadrático para CR: CR = 2514 + 1720.4x - 1096.6x<sup>2</sup>; R<sup>2</sup> = 0.55; p < 0.002.  
Efeito quadrático para GP: GP = 1023 + 1137.5x - 696.8x<sup>2</sup>; R<sup>2</sup> = 0.42; p < 0.01.  
Efeito linear para CA: CA = 2.28 - 0.156x; R<sup>2</sup> = 0.09; p < 0.003.

**Tabela 5** – Efeito da granulometria das dietas (DGM) sobre a energia metabolizável consumida (EMc), energia bruta das excretas (EBe), energia metabolizável das dietas (EMd) e nitrogênio retido (NR) (Experimento 2).

DGM (mm)	EMc(kcal)	EBe(kcal)	EMd(kcal/kg)	NR (%)
0.337	8805 b	3977 a	2042 b	65.12
0.574	9534 a	3854 b	2029 b	65.88
0.680	9414 a	3831 b	2395 ab	67.99
0.778	9426 a	3885 ab	2947 ab	68.02
0.868	9552 a	3850 b	2988 ab	67.99
0.936	9237 a	3873 b	2931 b	68.25
Probabilidade	0.001	0.003	0.01	0.240
C.V. (%)	2.62	1.50	1.82	3.66

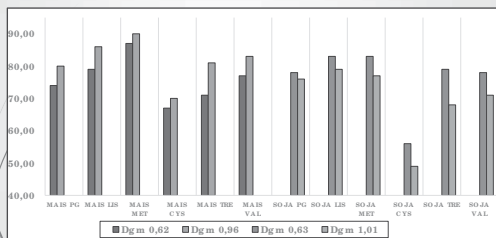
Medias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.  
Efeito quadrático para EMc: EMc = 7026.1 + 6971.3x - 4865a<sup>2</sup>; R<sup>2</sup> = 0.49 (p < 0.0002).  
Efeito quadrático para EBe: EBe = 4284 - 1190x + 818.8x<sup>2</sup>; R<sup>2</sup> = 0.37 (p < 0.01).  
Efeito quadrático para EMd: EMd = 2750.9 + 804.9x - 650a<sup>2</sup>; R<sup>2</sup> = 0.20 (p < 0.01).  
Efeito linear para NR: NR = 63.8 + 5.17x; R<sup>2</sup> = 0.17 (p < 0.01).

**Digestibilidade prececal (%) de Mais e Soja macinada em diversas granulometrias**

dgw	Mais			Farinha de Soja		
	0.62	0.96	p	0.63	1.01	p
CP	74	80	0.066	78	76	0.063
lys	79	86	0.058	83	79	0.019
Meth	87	90	0.214	83	77	0.092
Cys	67	70	0.303	56	49	0.121
Thr	71	81	0.009	79	68	0.048
Val	77	83	0.041	78	71	0.030

Ganzer C. et al. 16th Eur.Symp.Pou. Nutr., 2007

### Digeribilità prececale (%) di Mais e Soja macinata a diversa granulometria



### Macinazione fine: AME farina di Cane

d <sub>gw</sub>	Livello di sostituzione		
	20%	40%	media
0.590	2370	1880	2130 b
0.510	2800	2490	2650 a
0.420	2620	2440	2530 a
media	2600	2270	2435

Braga R. I 1996 PhD Thesis

### Effetto granulometria 7-21 giorni

	fine		media		grossa		P
	media	SE	media	SE	media	SE	
FI	532 b	±7.2	548a b	±6.7	561 a	±6.7	0.01
BWG	364 b	±4.4	376a	± 4.2	382 a	±4.1	0.017
FCR	1.461	±0.13	1.460	± 0.16	1.472	±0.10	0.78

Nir L, Melcion JP, Picard M. Poultry Science 69:(12) 2177-2184 (1990)

### Pulcini di 1-3 sett: effetto della S<sub>gw</sub>

Die ta	d <sub>gw</sub>	S <sub>gw</sub>	BWG	FI	G/ F
1	0.709	1.99	474 b	740	0.662b
2	0.769	1.63	522 a	725	0.725a
3	0.793	2.00	477 b	716	0.649b

Adattato da Nir L, et al. Poultry Science 73:45-49 (1994)

### Intera zione Pelle t-energia : 21-42 gg

Form a	Ene rgia (kca l/kg)	BWG (g)	FI (g)	FCR
fa rina	2900	1280	2745	2.15
pe lle ts	2900	1646	3357	2.04
sb ric io la to	2900	1566	3242	2.07
50/ 50 P S	2900	1617	3302	2.05

Adattato da Klein CH, Penz Jr. AM, Guidoni AL, de Brum PAR, CT/243/EMBRAPA-CNPISA, December 1999, p.1-4

### Intera zione Pelle t-energia : 21-42 gg

Form a	Ene rgia (kca l/kg)	BWG (g)	FI (g)	FCR
fa rina	2900	1280	2745	2.15
pe lle ts	2900	1646	3357	2.04
sb ric io la to	2900	1566	3242	2.07
50/ 50 P S	2900	1617	3302	2.05
fa rina	3200	1442	2830	1.96
pe lle ts	3200	1703	3130	1.84
sb ric io la to	3200	1632	3083	1.89
50/ 50 P S	3200	1646	3091	1.88

Adattato da Klein CH, Penz Jr. AM, Guidoni AL, de Brum PAR, CT/243/EMBRAPA-CNPISA, December 1999, p.1-4



## Mais e Grano : granulometria in farina e pellets

tipo	fine		grossa		fine	ISD
	farina	pellet	farina	pellet		
Starter	farina	pellet	farina	pellet	pellet	
Grower	farina	farina	farina	farina	pellet	
WG 0/8 d	138	177	131	182	179	12
WG 0/35 d	1890	2017	1948	2063	2118	58
FCR 0/8 d	1.258	1.142	1.256	1.139	1.122	0.049
FCR 0/35 d	1.562	1.577	1.554	1.588	1.639	0.023
Besa petto %	31.8	32.1	31.7	31.2	31.8	0.8
Gmssso a d.d.%	1.98	2.04	2.29	2.54	2.04	0.28

Modified from Wijten PJA, Langhout DJ, Perdok HB, pages 117-118  
14th European Symposium on Poultry Nutrition, Aug. 10-14, 2001, Lillehammer, Norway

## Dimensio ni de le partic le nello sb ric io la to

		d g w			fo m	
		0.508	0.743	1.050	fa rina	sb ric io la to
1-21g g	LW g	616	613	606	580	642
	FI g	1022	1007	1013	985	1042
	FCR	1.66	1.65	1.67	1.70	1.62
1-35g g	LW g	1463	1455	1452	1411	1502
	FI g	2603	2575	2615	2550	2646
	FCR g	1.78	1.77	1.80	1.81	1.76
1-42g g	LW g	1947	1938	1950	1901	1989
	FI g	3670	3627	3690	3595	3730
	FCR	1.89	1.87	1.89	1.89	1.87

Zanotto DL, de Brum PAR, Guidoni AL,  
CTIZZARIMBRAPA Sures e Aves, Maio 1998, p.1-2

Arg. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.4, p.1006-1013, 2007

### Efeitos da forma física da ração sobre a digestibilidade dos nutrientes e desempenho de frangos de corte

[Effects of physical form of ration on feed digestibility and performance of broiler chickens]

C.A.A. López, N.C. Batão, L.J.C. Lora, N.M. Rodríguez, S.V. Caçado

Escola de Veterinária da UFMG  
Caixa Postal 567  
30123-970 - Belo Horizonte, MG

Tabela 2. Coeficiente de metabolização (%) da matéria seca, nutrientes e energia metabolizável aparente, de acordo com a forma física da ração

Treatamento	CMMS (%)	CMPB (%)	CMEE (%)	EMA kcal/kg
Farelada	73,66	62,77b	68,87b	3020b
Granulada	72,50	63,79ab	74,64a	3030b
Expandida	73,09	64,63a	74,43a	3060a
CV (%)	0,86	1,93	1,38	0,72

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

Tabela 3. Desempenho de aves aos 42 dias de idade de acordo com os tratamentos

Treatamento	Peso corporal (kg)	Consumo ração (kg)	Conversão alimentar (kg/kg)	Viabilidade (%)
Farelada	2,597c	4,452b	1,744b	99,34
Granulada	2,828b	4,787a	1,719a	97,33
Expandida	2,874a	4,827a	1,706a	97,67
CV (%)	1,68	1,52	1,22	2,56

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si (P<0,05).



Revista Brasileira de Zootecnia  
© 2012 - Sociedade Brasileira de Zootecnia  
ISSN 1806-0500  
www.sbz.org.br

R. Bras. Zootec., v.41, n.1, p.66-66, 2012

### Influence of feed form and corn particle size on nutrient digestibility and energy utilization by young turkeys

André Favero<sup>1</sup>, Alex Maiorka<sup>1</sup>, Ana Vitória Fischer da Silva<sup>2</sup>, Fabio Luiz de Paula Valle<sup>1</sup>, Samuel Augusto dos Santos<sup>1</sup>, Keyesuke Muramatsu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, Curitiba  
<sup>2</sup> Departamento de Fisiologia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba  
<sup>3</sup> IASRI - Aichi Food 20K, Vila Rica, Santa Catarina

Table 2 - Retention (%) in the sieves of crumbled diets, and concentration of fines and pellet durability index (PDI) of micropellets (1.8-mm-diameter die) produced with different corn particle size (GMD, µm)

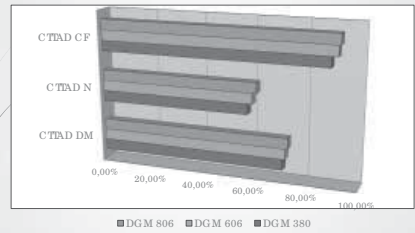
Feed form	GMD, µm		
	380	606	806
Crumbled			
4 mm	4.7	7.7	9.5
3 mm	8.0	18.2	15.4
2 mm	28.9	32.5	36.8
1 mm	33.9	26.1	26.3
0 mm <sup>1</sup>	24.5	15.6	12.1
Micropelleted			
Fines, %	17.81	14.22	11.22
PDI	98.4	98.4	97.6

<sup>1</sup> Bottom plate.

Table 2 - Influence of feed form (FF) and average corn particle size (GMD) on the coefficient of total tract apparent digestibility (CTAD) of dry matter (DM), nitrogen (N), crude fat (CF), AME and AME<sub>0</sub> of broilers at 18 to 21 d of age.

Item	GMD (mm)	CTAD %		AME (kcal/kg)	AME <sub>0</sub> (kcal/kg)
		DM	CF		
<b>Crusilla</b>					
FF	180	73.92ab	98.44	90.03	3.419
Modum	686	71.90a	99.45	91.22	3.377
Course	886	74.89a	93.60	93.03	3.447
<b>Macro-pollit</b>					
FF	180	70.92c	98.49	88.48	3.336
Modum	686	71.87ab	91.11	92.04	3.434
Course	886	72.43ab	99.91	92.88	3.332
Boiled SEM <sup>1</sup>		0.338	0.438	0.162	0.081
<b>DM</b>					
FF	358	71.87a	98.48a	89.25a	3.357
Modum	618	72.85a	93.74b	91.67a	3.153
Course	618	73.32a	93.80a	92.41a	3.448

### Granulometria del mais e CTIAD

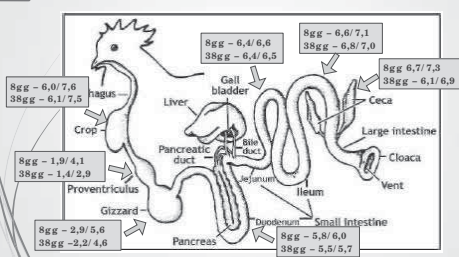


### Tempo di transito e pH nel tratto gastrointestinale del pollo

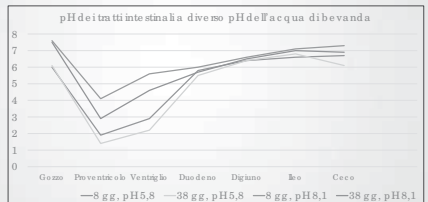
Segmento GIT	Tempo di transito	pH
Gozzo	50'	5.5
Proventricolo / ventriglio	90'	2.5-3.5
Duodeno	5-8'	5-6
Digiuno	20-30'	6.5-7.0
Ileo	50-70'	7.0-7.5
Colon	25'	8.0

Fonte : R.Gauthier(2002)

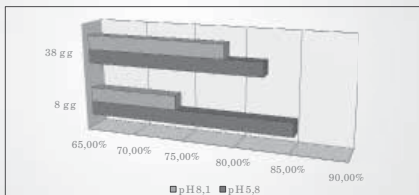
### Digeribilità e pH dell'acqua (5,8/8,1)



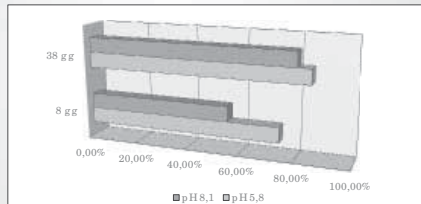
### Digeribilità e pH dell'acqua di bevanda (RAngelet al., non pubbl, 3-4 boiler per repl)



### Digeribilità leale apparente della SS a diverso pH dell'acqua di bevanda



### Digeribilità leale apparente del N a diverso pH dell'acqua di bevanda



### Credits & images

- King - UC Davis
  - Dupont/Watt media 14/01/2014
- E. Oviedo-Rondon - NCSU
  - Arkansas Nutrition Conference 2013
- King & McLelland,
  - Outline of Avian Anatomy, Bailliere Tindall, 1975
- Internet
- Wikipedia

Credits: immagini degli uccelli da [www.birds.it](http://www.birds.it) - by Luigi Sebastiani,







**FEDERICO PASTÒ**  
**Il controllo dell'ambiente**  
**nella prevenzione delle patologie**





# Il controllo dell'ambiente nella prevenzione delle patologie

I nuovi capannoni avicoli  
L'evoluzione



**Federico Pastò**

Servizio Tecnico Gruppo Amadori

E-mail: federico.pasto@amadori.it

Convegno annuale SI PA

Salsomaggiore Terme

8/9 Maggio 2014

Alimentazione

Genetica



Ambiente

Lo scopo del presente lavoro, è fornire le basi per ottenere un controllo sul microclima all'interno della struttura zootecnica.

La ventilazione gioca un ruolo fondamentale nel controllo ambientale e nella prevenzione delle patologie.

C'era una volta...



Piccoli passi...



!?!?!?!?!?



Prima o poi !!!

Per ottenere questo abbiamo quindi bisogno:



Una accurata progettazione

Ma soprattutto di un CONTROLLO del microclima



Obiettivi della ventilazione:

- limitare lo sviluppo di gas nocivi (CO, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, ecc.)
- fornire il corretto ricambio d'aria

ven  
tila  
zio  
ne

- rimuovere l'eccesso di umidità e calore
- gestione dei flussi d'aria, riduzione del pulviscolo

Tutti i suddetti valori sono tra loro strettamente legati, per creare un microclima

## Parametri di controllo microclimatico:

- Temperatura secca
- Temperatura esterna
- Velocità d'ingresso = depressione
- Velocità dell'aria in ambiente
- Umidità Relativa
- Temperatura effettiva (aria + irraggiamento corpi circostanti)
- CO<sub>2</sub> ed NH<sub>3</sub>

## TEMPERATURE

- Temperatura secca, ma non solo!!!



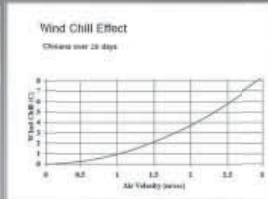
- Temperatura esterna!!!!



- Tra inverno ed estate l'aria può pesare anche il 15% in più

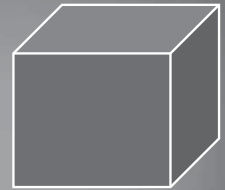
## TEMPERATURE

- Temperatura corpi circostanti
- Wind Chill



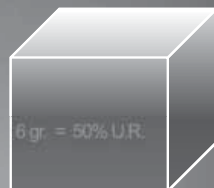
## UMIDITA' AMBIENTALE ARIA A 5°C

Un metro cubo d'aria è saturo, 100% U.R. con 6 gr. di acqua



## UMIDITA' AMBIENTALE ARIA A 15°C

Un metro cubo d'aria è saturo con 12 gr. di acqua



## UMIDITA' AMBIENTALE ARIA A 25°C

Un metro cubo d'aria è saturo con 24 gr. di acqua



## UMIDITÀ AMBIENTALE

### Controllo dei flussi

100%  
5 C

15 C 50%      25 C 25%

Riscaldando di 10 °C l'aria, si dimezza l'umidità relativa

## TEMPERATURE

- i parametri precedenti .....

Temperatura effettiva

## Minima Ventilazione:

- Minimo ricambio d'aria indispensabile ad immettere nel capannone aria fresca sufficiente a rimuovere l'eccesso di umidità e gas nocivi. Funziona con un timer.
- Ventilazione di Transizione: inizia quando il ricambio d'aria necessario supera il minimo, ossia, quando i sensori di temperatura e di umidità prendono il sopravvento sul timer, per mantenere i ventilatori in azione.

### Tabella ricambi d'aria minima ventilazione

Già determinata (giorni)	Mc d'aria all'ora per animale*	Mc d'aria totale all'ora	Tempo ON Ventilatore	Tempo OFF Ventilatore	Capli Accesi	Cap. n.
1	0,176	3.520	33	267		20.000
7	0,462	9.240	87	213		
14	0,649	12.980	122	178	Portata mc/h Ventilatore n° Gruppo	
21	0,824	16.480	173	127		32.000
28	1,023	20.460	192	108		
35	1,298	25.960	243	97	Quali Richiami Ora	
42	1,485	29.700	278	22		12
49	1,672		Ventilazione di Transizione	On Fisso		
56	1,870		Ventilazione di Transizione	On Fisso		
63	2,090		Ventilazione di Transizione	On Fisso		

## VENTILAZIONE INVERNALE

### Ingressi :

- aperture posizionate lungo tutta la struttura di allevamento, che immettono un flusso d'aria direzionato, creando moti convettivi

## VENTILAZIONE INVERNALE

### Ingressi invernali

Velocità 1X      Velocità 2X      Velocità 3X      Velocità 4X

PRONTI CALCOLATI SOTTO TEMPERATURA: 12-14°

Ventilazione	Velocità	Fluxo	Fluxo
Ventilazione 1	2,2 m/s	Fluxo 3	0,25
Ventilazione 2	3,2 m/s	Fluxo 4	0,25
Ventilazione 3	4,2 m/s	Fluxo 5	0,25
Ventilazione 4	5,2 m/s	Fluxo 6	0,25
Ventilazione 5	6,2 m/s	Fluxo 7	0,25
Ventilazione 6	7,2 m/s	Fluxo 8	0,25
Ventilazione 7	8,2 m/s	Fluxo 9	0,25
Ventilazione 8	9,2 m/s	Fluxo 10	0,25
Ventilazione 9	10,2 m/s	Fluxo 11	0,25
Ventilazione 10	11,2 m/s	Fluxo 12	0,25
Ventilazione 11	12,2 m/s	Fluxo 13	0,25
Ventilazione 12	13,2 m/s	Fluxo 14	0,25
Ventilazione 13	14,2 m/s	Fluxo 15	0,25
Ventilazione 14	15,2 m/s	Fluxo 16	0,25
Ventilazione 15	16,2 m/s	Fluxo 17	0,25
Ventilazione 16	17,2 m/s	Fluxo 18	0,25
Ventilazione 17	18,2 m/s	Fluxo 19	0,25
Ventilazione 18	19,2 m/s	Fluxo 20	0,25
Ventilazione 19	20,2 m/s	Fluxo 21	0,25
Ventilazione 20	21,2 m/s	Fluxo 22	0,25

Ad ogni ingresso, si ha un apporto di aria pulita che va a diluire l'aria entrata in precedenza, inoltre rimangono la sezione invariata, si ha un aumento della velocità di attraversamento.

## VELOCITÀ D'INGRESSO = DEPRESSIONE

Pa	Velocità m/sec
5	2,8
10	4,0
15	4,9
20	5,6
25	6,3
30	6,9
40	8,0

\*Temperatura esterna 10°C

Quindi la depressione, varia a seconda della larghezza del capannone e della temperatura esterna

### CONTROLLO DEI FLUSSI

NH<sub>3</sub> NH<sub>3</sub>

- eccessiva apertura, oppure aria naturale, pressione insufficiente

### CONTROLLO DEI FLUSSI

- effetto specchio, frequente nei soffitti piatti

### CONTROLLO DEI FLUSSI

particolare attenzione a tutti gli ostacoli che si trovano davanti al flusso d'aria

### CONTROLLO DEI FLUSSI

Flusso nel vuoto, ha bisogno di maggior velocità per raggiungere il centro del capannone

### CONTROLLO DEI FLUSSI

Flusso aderente al soffitto, necessita del 40% in meno di velocità per raggiungere il centro

### CONTROLLO DEI FLUSSI

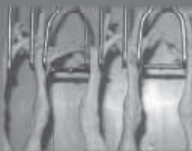
Flussi d'aria incontrollati, possono compromettere irreparabilmente la qualità della lettiera e quindi dell'animale

Puntatore 35.0 °C Puntatore 33.3 °C

FLIR FLIR



## CONTROLLO DEI FLUSSI



Stessa  
ALIMENTAZIONE



medesima  
GENETICA,

differente  
AMBIENTE

Qual'è il capannone con le finestrelle?



## VENTILAZIONE ESTIVA

Ingressi :



- aperture posizionate lato opposto ventilatori, questo per creare un effetto tunnel per avere la massima velocità sugli animali.

- Superficie dimensionata tra i 5 e 10 Pa

## VENTILAZIONE ESTIVA

Ventilatori :



- dimensionati in relazione alla sezione per ottenere la velocità desiderata «wind chill»

## VENTILAZIONE ESTIVA

Wind chill :



- riduzione di sezione
- Mai inferiore alla superficie delle finestre

## VENTILAZIONE ESTIVA

Raffreddamento:



- I sistemi di raffreddamento utilizzati, sono tutti evaporativi
- Siano Pad o similari, oppure con nebulizzatori
- pro e contro dei vari sistemi sono molteplici, non mi dilungo, altrimenti, .....



• TUTTI DUE I SISTEMI IMMETTONO H<sub>2</sub>O IN AMBIENTE



### Controllo del microclima, gas nocivi.

Il livello di controllo viene continuamente aggiornato per garantire il perfetto microclima, utilizzando sistemi di filtrazione per condurre gas i suoi punti.

Ogni valore rimane in un'archivio che fa lo scopo di un mio loggare gli essere sotto consultabile in ogni momento.

### Controllo del microclima, gas nocivi.

#### CO<sub>2</sub>

La massima concentrazione è nella fase iniziale, durante la fase di accensione dei gas combustibili del riscaldamento nell'ambiente.

In questo caso è chiaro, l'attivazione per l'apertura di sportelli e finestre, (esattamente piccoli).

### Controllo del microclima, gas nocivi.

#### NH<sub>3</sub>

Ammoniac come indicatore di benessere (umidità, ventilazione, procedure visita, comporta) l'instauramento dei livelli di NH<sub>3</sub>, inoltre a nota di risarcimento. l'intervento dell'attivatore nelle operazioni di fissatura e rimozione della lettiera.

### Controllo del microclima, Riscaldamento:

Ogni litro di GPL produce dalla combustione:

- Circa 6.100 Kcal
- 840 gr di H<sub>2</sub>O
- 0,8 m<sup>3</sup> di CO<sub>2</sub>

Per tale motivo il sistema sceglie sistemi di riscaldamento meno impattanti nell'ambiente, utilizzando reattori di fumi, acqua calda, o infarisco elettrico.

### Altri parametri nella fase progettata.

- La coibentazione, è prioritaria, nell'isolare il nostro «scatolone» dall'esterno

### Altri parametri nella fase progettata.

- Illuminazione

- L'orientamento attuale è verso il risparmio energetico con l'ausilio dei led.
- La possibilità di variare l'intensità luminosa da una fase di pulcinella ad una fase di svezzamento.
- Nel breve periodo l'utilizzo anche di frequenze differenti.

## Il controllo e la progettazione anche nelle ristrutturazioni:



Difficilmente ho trovato strutture che non si potevano riciclare alle nuove esigenze produttive.

Il controllo ambientale porta ad uniformare la performance ma soprattutto ad una regolarità dei risultati.

## Esito di una ristrutturazione:

E.P.E.F. allevamento modificato



## Non è così poi lontano il futuro:



Federico Pastò  
 Servizio Tecnico Gruppo Amadori  
 E-mail: federico.pasto@amadori.it



**PAOLA MASSI**

**L'utilizzo della vaccinazione  
come strumento di riduzione del farmaco**





53° Convegno della Società Scientifica di Patologia Aviare  
Salsomaggiore Terme (PR) , 9 maggio 2014

## L'utilizzo della vaccinazione come strumento di riduzione del farmaco

Paola Massi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Brescia



1

## Problematica dell'Antibiotico-resistenza

- Rapporto ESVAC 2013 sull'utilizzo di antimicrobici in 25 Paesi relativi anno 2011
- Decisione CE 653/2013 stabilisce regole per il monitoraggio della resistenza antimicrobica nelle produzioni primarie, carcasce al macello e carni fresche al dettaglio. Previsto cofinanziamento comunitario
- Piano nazionale del Ministero della Salute del 28/03/2014 Monitoraggio periodo 2014-2020

2

Piano nazionale del Ministero della Salute del  
28/03/2014  
Monitoraggio periodo 2014-2020

- Anni 2014, 2016, 2018 e 2020 per le galline ovaiole, i polli da carne, i tacchini all'ingrasso e le relative carni fresche
- Anni 2015, 2017 e 2019 le filiere suini e bovini e le relative carni fresche

3

## Introduzione

- La vaccinazione rappresenta un mezzo fondamentale per la prevenzione delle malattie infettive ed infestive
- Se applicata correttamente rappresenta una premessa importante per la loro eradicazione
- La vaccinologia ( Salk, 1976) ,disciplina che si occupa della ricerca, applicazione e sviluppo dei vaccini, è in continua evoluzione.



4

## Introduzione

- Le basi scientifiche del concetto di vaccinazione sono state fornite alla fine del 1700 dal medico Jenner che dimostrò che infettando con il vaiolo bovino proteggeva l'uomo dal vaiolo umano
- Nel 1800 Pasteur dimostrò la possibilità di attenuare virus e batteri per produrre vaccini
- A partire dagli anni '50 la produzione vaccinale si sviluppa progressivamente
- Una vera rivoluzione si è verificata negli ultimi 20 anni con l'avvento della biologia molecolare con la possibilità di vaccinare contro malattie come l'AIDS o la tubercolosi



5

## SCOPO DELLA VACCINAZIONE

Indurre la risposta immunitaria verso un patogeno senza provocare l'insorgenza dei sintomi



6

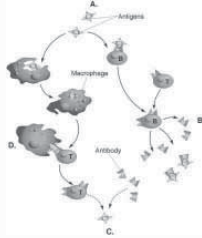


## Meccanismo d'azione dei vaccini

Preparazione antigenica la cui somministrazione induce in un soggetto suscettibile una risposta immunitaria specifica verso quel particolare agente infettivo

Composizione:

1. Antigene
2. adjuvante
3. conservante e/o stabilizzante
4. liquido di sospensione



La pratica della vaccinazione per la prevenzione delle malattie in ambito veterinario è utilizzata da tempo e continua ad essere considerata un sistema efficace per: **ridurre l'impatto economico delle malattie, migliorare la salute e il benessere animale**



7

8

## Evoluzione dei vaccini aviari vaccini tradizionali

**Vaccini vivi attenuati** sono i più usati

- Adatti alle vaccinazioni di massa
- Alta efficacia
- Costo medio basso



9

## Evoluzione dei vaccini aviari vaccini tradizionali

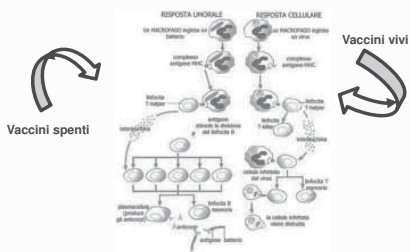
**Vaccini spenti**

- Necessari per stimolare titoli anticorpali elevati e durevoli
- Nei riproduttori assicurano livelli alti e uniformi di anticorpi materni nella progenie



10

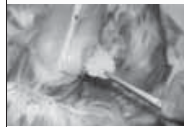
## Risposta immunitaria ai vaccini



11

## Limiti dei vaccini tradizionali

- > Eccessiva attenuazione
- > Instabilità genetica (reversione virulenza)
- > Contaminazioni con altri agenti patogeni
- > Termolabilità
- > Reazioni imponenti nel punto di inoculazione
- > Reazioni granulomatose
- > Amiloidosi



12



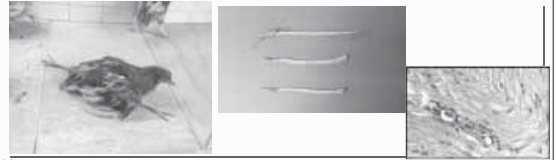
**Reazione da LTI**  
50gg. post vaccinazione  
idro



13



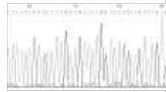
**Neuropatia periferica**  
**Reazione autoimmunitaria**  
La demielinizzazione sembra collegata ad un fenomeno autoimmunitario del MHC che stimola la formazione di anticorpi antimielina



14

### Vaccini di nuova generazione

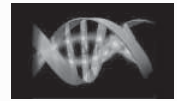
Modifica approccio allestimento vaccini  
→ LA SVOLTA.....  
↑ conoscenze meccanismi protezione ospite  
↑ conoscenze biologia molecolare e immunologia  
"esplosione" informazioni genomiche ospiti/patogeni  
Ricorso alle tecniche del DNA ricombinante



15

### Vaccini di nuova generazione

- Vaccini deleti (vivi attenuati)
- Vaccini ricombinanti
- Vaccini a subunità (proteine purificate)
- Vaccini a DNA (plasmidi batterici)



16

### Vaccini deleti

- Tecnologia del DNA ricombinante e conoscenza di specifici fattori di virulenza
- Strategia DIVA: Differentiating Infected from Vaccinated Animals



17

### Vaccini deleti autorizzati ad uso veterinario

- *Salmonella enterica* sierovar Typhimurium e sierovar Enteritidis (pollame)
- Vaccino per E.coli
- *Streptococcus equi* (deleto il gene aroA)
- Malattia di Aujeszky (doppia delezione gE e TK)
- Bovine herpesvirus tipo 1 (gE deleto)



18

## Vaccini ricombinanti a Vettori

- I vettori sono sistemi di trasporto di informazioni geniche spesso derivati da patogeni (virus e batteri modificati geneticamente e plasmidi)
- I vettori vaccinali sono un tipo particolare di Ag utilizzato per trasportare all'interno dell'organismo geni che codificano proteine immunogene



19

## Vettori virali e batterici aviari

1. Poxvirus
2. Adenovirus
3. Herpesvirus (HVT,MDV,ILTI)
4. NDV
5. Avian Influenza (H5N1)
6. Salmonella



20

## Vaccini Vettori

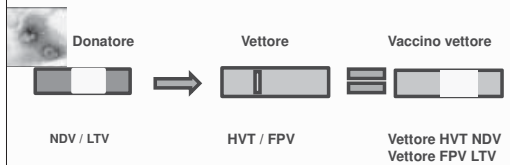
- Uno o più geni da un microorganismo sono inseriti nel DNA di un altro microorganismo al fine di esprimere gli Antigeni rilevanti che inducono una risposta immunitaria verso entrambi i microorganismi



21

## Vaccini Vettori

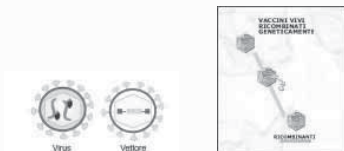
- **Donatore**: l'organismo che contribuisce con un gene che codifica per gli antigeni protettivi
- **Vettore**: virus o batterio attenuato usato per l'inserzione del gene



22

## Vettore Poxvirus

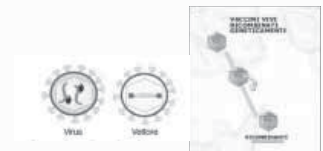
- Vaccini ricombinanti in grado di esprimere le proteine di superficie HN e/o F del NDV e l'antigene H5 del AI
- DIVA



23

## Vettore Herpesvirus

- Vaccino ricombinante con base l'herpesvirus del tacchino che esprime la VP2 del virus della malattia di Gumboro (IBDV)
- Vaccino ricombinante con base l'herpesvirus del tacchino che esprime il gene F del NDV
- DIVA



24

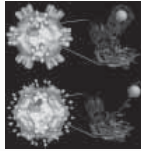
### Vaccini a Virus ricombinanti

Virus ricombinanti che contengono parti di due genomi strettamente correlati

Es: gene strutturale di un sierotipo e un gene non-strutturale di un altro sierotipo ma della stessa specie virale

#### VANTAGGIO

Unica somministrazione fornisce una risposta protettiva nei confronti di più varianti/sierotipi virali



25

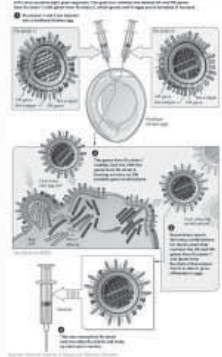
### Esempio di vaccino ricombinante

#### Vaccino influenza aviare

- HA H5N1
- NA H2N3
- base H1N1

#### IH5N3 RG

- completa protezione HP H5N1

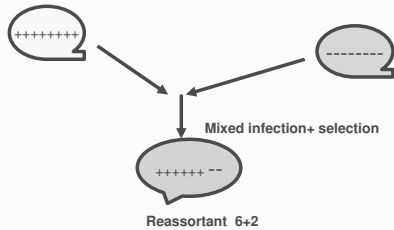


26

### RIASSORTIMENTO L'ESEMPIO DELL'INFLUENZA

Attenuated Master Strain

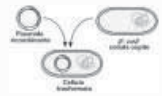
Human wild virus



27

### VACCINI A SUBUNITÀ

- Allestiti con proteine antigeniche prodotte ricorrendo alla tecnologia del DNA ricombinante
- Il gene che codifica la proteina viene isolato dal microrganismo e poi clonato in batteri (Coli), lieviti o virus.
- Le proteine possono essere espresse da sistemi procariotici o eucariotici a seconda della complessità dell'antigene



28

### VACCINI A SUBUNITÀ

#### VANTAGGI

- Sicurezza
- Compatibili con la strategia DIVA

#### SVANTAGGI

- Scarsa antigenicità
- Necessità di aggiungere **adiuvanti**

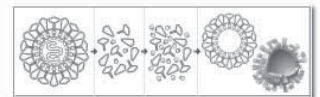
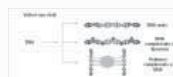


29

### VIROSOMI

- Liposomi che veicolano proteine virali dell'envelope
- simulano in tutto e per tutto l'envelope virale
- è possibile ancorare integrare legare o inserire all'interno del virosoma proteine multiple

- > Metapneumovirus subtype C (immunizzazione di tacchini per via IN)
- > Newcastle disease



30

### Vaccini a DNA

- Utilizzano plasmidi batterici codificanti per proteine immunogene
  - DNA plasmidico di derivazione batterica contenente uno o più geni eterologhi
  - Somministrato per via intradermica o intramuscolare
- **Influenza aviare:** vaccino DNA per espressione di HA
- **ND:** vaccino a DNA contenente il gene codificante per la proteina F di fusione



31

### Vantaggi dei vaccini a DNA

- Stimolano elevata risposta cellulo-mediata pari ai vaccini vivi senza rischi di infezione in quanto sono assenti gli agenti infettanti
- Immunità di lunga durata
- Stabili al calore
- Si possono facilmente aggiornare coi ceppi varianti



32

### Vantaggi dei vaccini di nuova generazione

- Sicurezza
- Maggiore stabilità
- Mancata interferenza con gli Ab materni
- Immunità più prolungata
- DIVA



33

### Novità degli ultimi anni per i vaccini aviari nel nostro Paese

#### Metodi di vaccinazione

- Vaccinazione in «ovo» a 17-18 gg. di vita embrionale per la M.di Marek e altri

#### •Vaccini virali e batterici prodotti con le nuove tecnologie

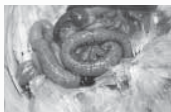
- Vaccino vettore HVT+ VP2 dell'IBDV
- Vaccino a immunocomplessi per IBDV
- Vaccini termo-sensibili
- Vaccini marcati ( vaccini vivi per Salmonella)

34

### Vaccino per Coccidiosi

#### Innovazione assoluta!

I vaccini sono costituiti da linee precoci delle più comuni specie di Eimeria, selezionate per il loro breve ciclo nell'ospite.



35

### Vaccini batterici

Strumento diretto che possiamo utilizzare per ridurre il consumo del farmaco

36

### Vaccini batterici

Alcuni esempi di vaccinazioni con ceppi batterici che hanno fortemente ridotto l'utilizzo del farmaco

> Vaccinazione spenta contro la Corizza infettiva



37

### Vaccini batterici

- Vaccinazione spenta contro il *Mycoplasma gallisepticum* (ceppo S6 in emulsione oleosa)
- Vaccinazione con vaccini vivi contro il *Mycoplasma gallisepticum* (oculo e spray)

DIVA



38

### Vaccini batterici

• Vaccinazione con vaccino spento per E.Coli (antigeni F11 delle fimbrie e tossine flagellari FT)

• Vaccinazione con vaccino vivo modificato per E.Coli **deleto per il gene aroA tipo078** da utilizzare spray

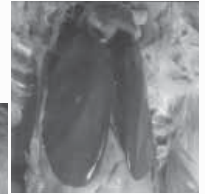
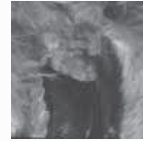


39

### Vaccini batterici

1. Vaccino vivo per *Salmonella gallinarum* ceppo rugoso per via parenterale
2. Vaccino vivo per *Salmonella gallinarum* idro

DIVA



40

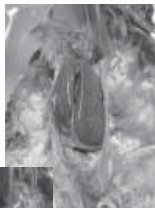
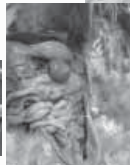
### Vaccini batterici

1. **Vaccini spenti contro le *Salmonelle enteritidis* e *typhimurium***
2. **Vaccini vivi contro le *Salmonelle enteritidis* e *typhimurium***

• Vaccino vivo attenuato per mutazione metabolica marcato con tre marker legati alla sensibilità antibiotica

• Vaccino attenuato per auxotrofismo chimico marcato per adenina/istidina dipendente

• DIVA

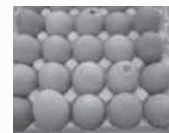


41

### Vaccini batterici

- Vaccino spento per *Mycoplasma synoviae*
- Vaccino vivo per *Mycoplasma synoviae*

• DIVA



42



### Vaccini stabulogeni IZSLER per il settore avicolo

- Bronchite Infettiva con ceppo Fornino/83
- R.Anatipestifer
- E.Coli
- Salmonella del piccione
- Pasteurellosi aviare
- Artrite Stafilococcica
- Ornithobacterium rhinotracheale
- Salmonella hadar (500.000 dosi)
- Vibriosi



43

### Vaccino Coli-stabulogeno IZSLER-

2007	2007	2007	2007	2011	2012	2013	2014
163500	820000		0208000	929000	620000	510000	90000

Totale 3.340.000 dosi

44

### Vibriosi -vaccino stabulogeno IZSLER-

2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
10000	40000	26000	100000	102000	84000	36000	90000
280000	25000	100000	34000	160000	150000	215000	
132000		60000	30000		50000	130000	
180000		19000	76000		205000	105000	
100000			560000		105000	23000	
130000			204000		44000	66000	
280000			240000				



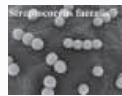
Totale 4.191.000 dosi

45

### Spondilolistesi nel riproduttore

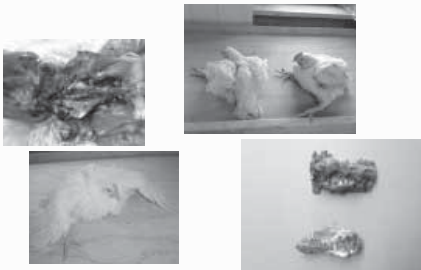
#### Prossimo futuro?

Pensare ad un vaccino per *Enterococcus faecium* / *faecalis* / *cecorum*



46

### Spondilolistesi nel broiler



47

### Artropatia amiloide



#### Nanismo della pollastra

*Enterococcus faecalis*



180.000 dosi di stabulogeno in prova

48



53° Convegno della Società Scientifica di Patologia Aviaria  
Salsomaggiore Terme (PR) , 9 maggio 2014

**Grazie per l'attenzione!**



Massi Paola  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-  
Brescia



49



LIV CONVEGNO ANNUALE

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Forlì, 16-17 Aprile 2015



## APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE DI UN PROTOCOLLO DI PCR IN GRADO DI DISCRIMINARE IL CEPPPO VACCINALE SG9R

Bano L.<sup>1</sup>, Pascoletti S.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Brunetta R.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>2</sup>, Viel L.<sup>1</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di BATTERIOLOGIA Speciale, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba, Treviso

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro, Padova

### Summary

Twenty-six non-motile *Salmonella* strains have been processed by a PCR protocol able to discriminate biovars Pullorum, Gallinarum and the vaccine strain SG9R. Results revealed that SG9R strain may persist up to 12 weeks in flock affected by Marek disease. In addition, the vaccine strain has been isolated in day-old unvaccinated chicks leading to suppose a vertical transmission with eggs. Vaccine strains have been detected in flocks with high mortality and with gross lesions due to other septicemic diseases and, on the contrary, one wild strain has been isolated from the necrotic liver of one affected bird in a vaccinated flock where no anomalous mortality has been recorded. The studied PCR protocol showed to be a rapid and useful tool to identify non-motile *Salmonella* spp. of poultry origin and differentiate a well-known vaccine strain used to contain a notifiable disease from *Salmonella* Pullorum and Gallinarum field strains.

### INTRODUZIONE

Le biovarianti Pullorum (SP) e Gallinarum (SG) di *Salmonella enterica* subspecie *enterica* sierotipo Gallinarum, sono responsabili di 2 importanti patologie del pollame denominate rispettivamente pullurosi e tifosi aviare. Entrambe sono malattie setticemiche che possono causare pesanti perdite negli allevamenti avicoli, ma mentre la pullurosi è tipica dei soggetti giovani, la tifosi aviare colpisce animali adulti. La distinzione tra SG e SP non è semplice poiché si basa su poche prove biochimiche differenziali quali la fermentazione del dulcitol e del glucosio e la decarbossilazione dell'ornitina, e queste risultano a volte di difficile interpretazione (OIE, 2012). Mentre la pullurosi è soggetta a piani di eradicazione nei riproduttori, la tifosi aviare viene controllata comunemente attraverso l'impiego di vaccini vivi attenuati allestiti con ceppi di SG che fenotipicamente producono colonie in fase "rugosa", tra i quali il più noto è il ceppo SG9R (Harbourne *et al.*, 1963). La fase "rugosa" è evidenziabile in laboratorio attraverso la prova di solubilizzazione in soluzione di acriflavina delle colonie, ma questa prova non è ufficialmente riconosciuta per la differenziazione del ceppo vaccinali SG9R da quelli di campo. La vaccinazione è uno strumento utile per prevenire le manifestazioni cliniche in allevamento, ma non conferisce una protezione completa rispetto all'infezione (OIE, 2012). Da un punto di vista genetico le differenze tra il ceppo vaccinale e quello di campo sono limitate alla sostituzione di singole paia di basi, rendendo perciò plausibile la possibilità di una



rivirulentazione in campo del ceppo vaccinale, peraltro mai dimostrata (Okamoto *et al.*, 2010; Van Immerseel *et al.*, 2013).

Dato che il ceppo vaccinale SG9R può persistere negli organi parenchimatosi di soggetti vaccinati fino alla 5<sup>a</sup> settimana post-inoculazione (Silva *et al.*, 1981), ai fini diagnostici è importante avere la possibilità di discriminare tale ceppo da quelli di campo isolati in gruppi vaccinati in cui si osservi un aumento di mortalità e si giunga all'isolamento di una salmonella immobile.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

L'indagine ha riguardato 26 ceppi immobili di *Salmonella* spp, isolati tra il 2005 e il 2014 in 13 allevamenti, nel corso della consueta attività diagnostica. L'isolamento era avvenuto prevalentemente da organi parenchimatosi (fegato e milza) e/o sacchi aerei, e i ceppi erano stati identificati a livello di biovariante mediante prove biochimiche standard e sottoposti a sierotipizzazione utilizzando sieri rivolti verso antigeni somatici. Nello studio sono stati inclusi come controllo 2 ceppi vaccinali appartenenti a 2 diversi lotti di produzione.

### *Protocollo di PCR*

Per la differenziazione molecolare dei ceppi è stato applicato un protocollo di PCR in grado di identificare SP, SG e il ceppo vaccinale SG9R (Min-Su *et al.*, 2012).

Rispetto a quanto pubblicato sono state apportate alcune modifiche. In particolare, il DNA è stato estratto da colture pure di 24 ore cresciute su agar sangue utilizzando il kit Mag Max Total Nucleic Acid Extraction (Ambion). Altre modifiche del protocollo originale hanno riguardato la temperatura di annealing, la concentrazione di Mg e la coppia di primers SG.

## **RISULTATI**

I risultati vengono riassunti in tabella 1.

Tra i 26 ceppi di salmonelle immobili testati, 13 sono risultati ceppi di SG di campo, 10 ceppi vaccinali SG9R e 3 SP.

In alcuni episodi di malattia sono stati isolati più ceppi da soggetti diversi, da organi diversi o in momenti diversi, ma quelli di uno stesso gruppo hanno dato sempre lo stesso risultato mediante PCR. In particolare si evidenzia il ripetuto isolamento del ceppo vaccinale SG9R a 18, 22 e 30 settimane in un gruppo di ovaiole vaccinate due volte in fase di pollastra (9 e 16 settimane), e colpite da malattia di Marek (gruppo "C"). Inoltre è risultato vaccinale anche un ceppo isolato da pulcini di 1 giorno destinati alla produzione di uova (gruppo "A").

## **DISCUSSIONE**

La tifoosi aviare è una malattia che è stata inserita nel regolamento di polizia veterinaria negli anni in cui era ampiamente diffusa in Italia e si presentava spesso nella sua forma iperacuta. L'introduzione della vaccinazione con ceppi vivi attenuati ha consentito di ridurre notevolmente l'incidenza della malattia e ha contribuito ad

attenuare la gravità delle manifestazioni cliniche.

L'impiego di ceppi vaccinali ha posto però delle difficoltà dal punto di vista diagnostico non essendo disponibile un metodo ufficiale per la differenziazione tra "ceppo vaccinale" e "ceppo di campo". I risultati ottenuti in questo studio hanno dimostrato che la circolazione del ceppo vaccinale nel gruppo può perpetuarsi fino a 12 settimane, probabilmente favorita dalla simultanea presenza di una malattia immunodepressiva come la malattia di Marek (gruppi "C" ed "E"). Sebbene l'isolamento di una salmonella immobile in pulcini di pochi giorni debba fare sospettare in primis SP, non è escluso che si possa trattare invece del ceppo vaccinale SG9R, probabilmente trasmesso dai riproduttori tramite le uova e rimasto vitale anche dopo la schiusa (gruppo "A").

Il nostro studio ha messo in evidenza alcune situazioni in cui la diagnosi di tifosi aviare basata su sintomatologia, lesioni compatibili e isolamento del microrganismo, senza possibilità di discriminazione dal ceppo vaccinale, potrebbe risultare non corretta. Infatti, ceppi vaccinali possono essere isolati in gruppi dove si osserva elevata mortalità e lesioni setticemiche imputabili a microrganismi diversi da SG (ad es. *Escherichia coli*), come osservato nel gruppo "G" (Tabella 1). Al contrario, ceppi di campo possono essere isolati da singoli individui con lesioni anatomopatologiche caratteristiche della tifosi aviare, appartenenti a gruppi vaccinati con mortalità nella norma come osservato nel gruppo "Q" (Tabella 1).

In entrambi i casi la discriminazione fra ceppo di campo e ceppo vaccinale è indispensabile da un lato per non incorrere in errori diagnostici con possibili ripercussioni di polizia veterinaria e, dall'altro, per prendere coscienza della circolazione di ceppi di campo e poter adottare tutte quelle azioni di profilassi diretta e indiretta necessarie ad evitare la forma clinica della malattia nei successivi cicli di allevamento. A tale proposito si ricorda che l'eradicazione di ceppi di campo in allevamenti infetti è strettamente legata, oltre che ad accurate operazioni di pulizia e disinfezione a fine ciclo, anche all'eliminazione di eventuali vettori biologici, primo fra tutti *Dermanyssus gallinae* (Wales *et al.*, 2010).

## **BIBLIOGRAFIA**

Harbourne J. F., Williams B. M., Parker W. H., Fincham I. H. (1963). The prevention of fowl typhoid in the field using a freeze-dried 9R vaccine. *Vet. Rec.*, 75, 858–861.

Min-Su K., Yong-Kuk K., Hye-Ryoung K., Jae-Young O., Mi-Jin K., Byung-Ki A., Eun-Gyeong S., Jun-Hun K., Choi-Kyu P. (2012). Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Veterinary Microbiology*, 160:491–495.

OIE Terrestrial Manual (2012). Chapter 2.3.11. — Fowl typhoid and Pullorum disease. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.11\\_FOWL\\_TYPHOID.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf)

Okamoto A. S., Menconi A., Gonçalves G. A. M., Rocha T. S., Andreatti Filho R. F., Savano E. N.,

Sesti L. (2010). Reversion to virulence evaluation of a 9R vaccine strain of salmonella enterica serovar gallinarum in commercial brown layers. Brazilian Journal of Poultry Science, 12 (1):47-52.

Silva, E. N., Snoeyenbos, G. H., Weinack O. M., Smyser C. F. (1981). Studies on the use of 9R strain of Salmonella gallinarum as a vaccine in chickens. Avian Diseases. 25:38-52.

Van Immerseel F., Studhome D. J., Eeckhaut V., Heyndrickx M., Dewulf J., Dewaele I., Von Hoorebeke S., Haesebrouck F., Ven Meirhaehe H., Ducatelle R., Paszkiewicz K., Titball R. W. (2013). *Salmonella* Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. Vaccine, 31:4940-4945.

Wales A.D., Carrique-Mas J.J., Rankin M., Bell B., Thind B.B. & Davies R.H. (2010) Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to Salmonella in mites, flies and litter beetles. Zoonoses Public Health, 57, (5), 299–314.

Allev.	Gruppo	Età (settimane)	Vaccinazione (SG9R)	Mortalità anomala	Lesioni compatibili con SG o SP	Altre patologie	Organo	Ceppi testati per gruppo	Risultato PCR
1	A	1	No	No	No	No	Pool org.	1	SG9R
2	B	12	No	Si	Si	No	Fegato	1	SP
3	C	18 -22- 30	Si	Si	Si	Marek	Milza, pericardio	3	SG9R
	D	24	Si	Si	No	Colisetticemia	Sacco aereo	1	SG9R
	E	26	Si	Si	Si	Marek	Sacco aereo	1	SG9R
4	F	80 85	Si	No	Si	Colisetticemia	Milza, sacco aereo, ovidutto	6	SG
5	G	28	Si	Si	Si	Colisetticemia	Sacco aereo	1	SG9R
6	H	26	Si	No	Si	No	Fegato	4	SG
7	I	22	No	Si	Si	No	Fegato	1	SG
8	L	1	No	Si	Si	No	Fegato	2	SP
9	M	ND	Si	ND	ND	ND	ND	1	SG9R
10	N	ND	Si	Si	Si	No	Milza, ovaio, cervello, polmone	1	SG
11	O	13	Si	No	No	ND	Pool org.	1	SG9R
12	P	ND	Si	No	No	No	Milza	1	SG9R
13	Q	20	Si	No	Si	No	Fegato	1	SG
lotto A	-	-	-	-	-	-	-	-	SG9R
lotto B	-	-	-	-	-	-	-	-	SG9R

**Tabella 1.** Risultati ottenuti dall'applicazione del protocollo oggetto dello studio in relazione all'età degli animali, alla mortalità anomala rilevata, all'osservazione di lesioni anatomopatologiche compatibili con pullurosi o tifosi aviare e alla presenza o meno di altre patologie. SP: Biovariante Pullorum; SG: Biovariante Gallinarum; SG9R: ceppo vaccinale 9R; ND: informazione non disponibile.

# VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ANTICORPALE DI POLLI DA CARNE INFETTATI SPERIMENTALMENTE CON *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* NETB-POSITIVO

Bano L.<sup>1</sup>, Tonon E.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, De Zan G.<sup>1</sup>, Bonfante F.<sup>2</sup>, Terregino C.<sup>2</sup>, Cattoli G.<sup>2</sup>, Vascellari M.<sup>3</sup>, Mazzolini E.<sup>4</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sezione Diagnostica di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba, Treviso

<sup>2</sup> Laboratorio di Virologia Speciale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro

<sup>3</sup> Laboratorio di Istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro

<sup>4</sup> Dipartimento di Epidemiologia Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Pozzuolo 330, 33100 Udine

## Summary

Recombinant NetB toxin (rNetB) and the dialyzed product of a *C. perfringens* NetB-positive strain (dNetB+) were used as antigens of two direct enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The developed serological tests were used to study the humoral response of chickens that experienced necrotic enteritis induced by oral administration of a NetB-positive *C. perfringens* culture. Sera of orally infected chickens were collected before infection and up to the 4<sup>th</sup> week after infection. Chickens subcutaneously immunized with rNetB, dNetB+ and the dialyzed product of a *C. perfringens* NetB-negative culture (dNetB-), were included in the study. There was no difference in the antibody amounts of orally infected chickens and the non-infected group (control). The ELISA with rNetB was able to discriminate chickens immunized with dNetB- better than did the one set up with dNetB+. The experimental protocol used to induce NE was successful and produced both gross and histological relevant lesions. Based on our results, experimentally induced necrotic enteritis was incapable to stimulate a humoral immunity detectable with our ELISAs. However, dNetB+ -based ELISA represents a promising tool to study antibody dynamics in naturally exposed subjects and parenteral immunized chickens.

## INTRODUZIONE

La tossina NetB prodotta da *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) è considerata il principale fattore di virulenza implicato nella patogenesi dell'enterite necrotica del pollo. E' una "pore forming toxin" di 33 kDa in grado di ledere in modo irreversibile la membrana citoplasmatica della cellula dell'ospite causandone la morte (Keyburn *et al.*, 2008). La somministrazione sottocutanea di tossina NetB ricombinante (rNetB) si è dimostrata in grado di generare IgY specifiche evidenziabili attraverso metodi immunoenzimatici (Keyburn *et al.*, 2013), in letteratura, tuttavia, non risultano studi sulla risposta anticorpale di animali che abbiano sperimentato la malattia in condizioni di campo o infettati sperimentalmente per via orale.

Scopo della presente ricerca era quello di sviluppare un test sierologico in grado di

rilevare anticorpi prodotti nei confronti di *C. perfringens* e della sua tossina NetB per migliorare le conoscenze sulla risposta anticorpale in modelli sperimentali. I risultati riportati nel presente lavoro sono stati ottenuti nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 09/11 "Sviluppo di un kit ELISA per la valutazione della risposta anticorpale a tossine prodotte da *C. perfringens* e *C. septicum* nel pollo", finanziata dal Ministero della Salute.

## **MATERIALI E METODI**

### *Produzione dell'antigene*

Per l'allestimento del test immunoenzimatico (ELISA) sono stati utilizzati come antigeni sia la tossina NetB ricombinante (rNetB) che il prodotto di una coltura dializzata di *C. perfringens* NetB+ (dNetB+).

La rNetB è stata prodotta secondo quanto riportato in letteratura (Keyburn *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2012). La produzione della tossina è stata verificata mediante western blotting utilizzando un siero specifico anti-NetB prodotto su coniglio e gentilmente fornito dal Dr. R. Moore (CSIRO Biosecurity Flagship, Australian Animal Health Laboratory).

L'antigene prodotto in coltura dializzata, e i sieri di controllo con questo ottenuti, sono stati cortesemente forniti dal Dr. A. Ferrarese (Sezione Diagnostica di Vicenza, IZS delle Venezie). L'antigene dializzato è stato prodotto coltivando un ceppo di *C. perfringens* NetB-positivo all'interno di un sacco da dialisi con porosità compresa tra 10 e 20 kDa, immerso in terreno TPG (Lesley *et al.*, 1989), con L-cisteina (0,1%) in sostituzione del tioglicolato. L'apparato da dialisi così costituito è stato successivamente incubato a 37 °C per 18 ore. Al termine dell'incubazione il contenuto del sacco veniva raccolto, centrifugato a 6100 x 30 minuti ed il sopranatante trasferito in altro sacco da dialisi e lavato immergendolo per 48 ore in soluzione fisiologica. Un secondo antigene è stato prodotto in coltura dializzata come sopra esposto, ma impiegando un ceppo NetB negativo (dNetB-).

### *Sieri di controllo*

La rNetB è stata utilizzata per effettuare una doppia immunizzazione a 2 polli per via sottocutanea a distanza di 10 giorni, impiegando una combinazione di adiuvanti suggerita in letteratura (Keyburn *et al.*, 2013). Gli antigeni dNetB+ e dNetB- sono stati adiuvati in idrossido di alluminio e somministrati ciascuno a 3 polli per 3 volte a distanza di 3 settimane per via parenterale.

Come controllo negativo è stato utilizzato il siero di un pollo SPF di 2 mesi d'età.

### *Riproduzione della malattia*

La sperimentazione di seguito descritta è stata condotta in ottemperanza a quanto previsto dal D. L.vo 116/92 e successive modificazioni e integrazioni, previo parere favorevole del comitato etico dell'IZS delle Venezie.

Per la riproduzione della malattia sono stati impiegati 78 polli bianchi forniti da incubatoio commerciale e accasati all'età di 1 giorno. Il primo giorno di vita 26 soggetti sono stati salassati e i pacchetti intestinali sottoposti alla ricerca di *C. perfringens* attraverso tecniche di biologia molecolare quali-quantitative (Wu *et al.*, 2011). I

restanti pulcini sono stati suddivisi in 2 gruppi di 26 soggetti ciascuno e stabulati in box. L'alimentazione *ad libitum* era assicurata da mangiatoie a campana mentre l'acqua di bevanda era somministrata tramite abbeveratoi a goccia. Il 7° giorno i soggetti di entrambi i gruppi sono stati singolarmente identificati mediante apposizione di anello numerato su un arto inferiore. Il gruppo "controllo" è stato alimentato con mangime commerciale mentre al gruppo "trattato" sono stati somministrati consecutivamente 3 tipi diversi di mangime denominati "starter" (da 1 a 8 gg), "grower" (9-16) e "finisher" (17-49). La fonte di cereale contenuta in tutti i 3 tipi di mangime era costituita da frumento (43%) e riso (7,5%) mentre quella proteica proveniva da farina d'estrazione di soia (25%) per i mangimi "starter" e "grower" e da farina di aringhe (30%) per il "finisher". Il mangime "grower" si differenziava dallo "starter" per una maggiore concentrazione lipidica.

L'infezione sperimentale del gruppo "trattato" è stata eseguita utilizzando il ceppo "CP 56" (tipo A, NetB-positivo), cortesemente fornito dal Prof. F. Van Immerseel dell'Università di Gent (Belgio).

A partire dal 18° giorno di vita e per 4 giorni consecutivi, il gruppo sperimentale è stato infettato per via orale con 1 mL di una sospensione batterica contenente  $1 \times 10^8$  UFC/mL di *C. perfringens*, somministrata per 3 volte al giorno a distanza di 4 ore. Il 19° giorno di vita, i soggetti del gruppo sperimentale sono stati singolarmente vaccinati per coccidiosi per via orale (Paracox-5<sup>MT</sup>, MSD), secondo la posologia indicata nel foglietto illustrativo del prodotto.

#### *Accertamenti diagnostici*

Il giorno dell'arrivo e settimanalmente sino al 49° giorno d'età, sono stati eseguiti prelievi di sangue da soggetti di entrambi i gruppi ("trattato" e "controllo"). In concomitanza con il prelievo ematico sono state valutate le condizioni cliniche degli animali e i pesi di ciascun soggetto. Alcuni mesi dopo tale prova, sono stati accasati nuovamente 26 pulcini provenienti dallo stesso incubatoio e alimentati solo con i mangimi sperimentali utilizzati nella precedente prova per il gruppo "trattato", per verificare se le eventuali differenze ponderali del gruppo fossero da attribuire al mangime o alla malattia. L'accrescimento ponderale è stato valutato sino al 42° giorno di vita e le differenze tra i gruppi studiate attraverso il test dell'analisi della varianza (ANOVA). Per verificare l'induzione della malattia nel gruppo "trattato", il 27° giorno d'età, 10 soggetti di ogni gruppo sono stati sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico. Le lesioni a carico dell'intestino sono state classificate con uno score compreso tra 1 e 6, secondo quanto proposto da Shojadoost e coll. (2012). Durante l'esame necroscopico sono stati inoltre prelevate porzioni intestinali in corrispondenza del diverticolo di Meckel di tutti i soggetti e da tratti con lesioni macroscopiche evidenti o dubbie, da sottoporre ad esame istopatologico. Alle lesioni istologiche è stato assegnato uno score sulla base della gravità delle stesse, così definito: score "0" = assenti lesioni; score "1" = diffusa e lieve enterite erosiva associata ad infiltrazione linfoplasmocitaria e di più rari eterofili della lamina propria; score "2" = diffusa enterite necrotico-erosiva linfoplasmocitaria di grado moderato; score "3" = diffusa grave enterite necrotica che interessa i 2/3 superficiali della mucosa con rari focolai ulcerativi e moderata infiltrazione linfoplasmocitaria diffusa.



Un grammo di contenuto intestinale raccolto in pool da vari tratti di ciascun soggetti sacrificato, è stato sottoposto a ricerca di *C. perfringens* sia attraverso tecniche di batteriologia classica che mediante real-time PCR (Wu *et al.*, 2011). La ricerca microbiologica di *C. perfringens* è stata eseguita previo arricchimento del campione in brodo Cooked Meat Medium (CMM). Dopo 48 ore d'incubazione a 37 °C in condizioni d'anaerobiosi, i CMM sono stati seminati su terreno agarizzato Perfringens Agar Base, a sua volta incubato a 37 °C in anaerobiosi (Oxoid). Dopo 24-48 ore le colonie sospette sono state isolate e identificate mediante MALDI TOF (MALDI LT Biotyper, Bruker Daltonics) e i ceppi di *C. perfringens* sono stati successivamente sottoposti alla ricerca del gene codificante la tossina NetB mediante PCR (Keyburn *et al.*, 2008). In tutti i soggetti è stato eseguito un esame parassitologico tramite osservazione microscopica diretta del raschiato intestinale, raccolto sia da intestino tenue che da cieco.

#### *Allestimento del test ELISA*

Per la messa a punto del metodo sono state effettuate varie prove valutando l'ottimale concentrazione di antigene, anticorpo primario e coniugato.

Piastrine Maxisorp NUNC-immunoplate sono state coattate con 0,5 µg /pozzetto di rNetB, diluita in tampone carbonato (pH 9.6), e incubate per 1,5 ore a 37 °C. È seguito il lavaggio con PBS contenente 0,05 % di Tween-20 (PBS-T) per 3 volte e blocco dei siti aspecifici con BSA al 6% per 1 ora a 37°C. Successivamente si è proceduto al lavaggio con PBS-T (3 volte) e all'incubazione per 1 ora a 37 °C con 100 µL/pozzetto dei sieri di pollo diluiti 1:100. Le piastrine sono state poi nuovamente sottoposte a triplice lavaggio con PBS-T e quindi incubate con 100 µL/pozzetto di una soluzione 1:5000 di anticorpi anti-IgY di pollo, coniugati con perossidasi (Sigma). La piastra è stata quindi nuovamente incubata per 1 ora a 37 °C e successivamente lavata come precedentemente descritto. La presenza di legame specifico è stata poi rilevata aggiungendo a ciascun pozzetto 100 µL di substrato (ABTS peroxidase substrate system, KPL). La lettura spettrofotometrica è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 405 nm (SunRise, TECAN).

Il medesimo test è stato allestito impiegando il prodotto della coltura dializzata del ceppo di *C. perfringens* dNetB+ diluito 1/40.

I risultati del test ELISA ottenuti dai soggetti dei gruppi “trattato” e “controllo” sono stati normalizzati applicando la formula (OD campione – OD controllo neg)/ OD controllo positivo.

## **RISULTATI**

I pulcini di entrambi i gruppi sono risultati negativi per *C. perfringens* all'arrivo e la valutazione clinica settimanale degli animali eseguita sino al 18° giorno d'età non ha permesso di evidenziare alcun sintomo di malattia. Il 4° giorno post-infezione, 14/26 soggetti del gruppo “trattato” presentavano imbrattamento fecale della regione pericloacale da “moderato” a “grave”.

Dopo 6 settimane, i soggetti del gruppo “infetto” pesavano mediamente 317 gr/capo in meno rispetto al gruppo alimentato con il mangime commerciale e 112 gr/capo in meno rispetto al gruppo alimentato con lo stesso mangime sperimentale (figura 2).

La differenza fra le medie dei pesi raggiunti alla sesta settimana di vita dal gruppo “trattato” e quelle degli altri 2 gruppi è risultata statisticamente significativa ( $P=0,05$ ). Gli score (LS) assegnati alle lesioni osservate all’esame anatomopatologico e istologico si sono dimostrati significativamente più elevati nel gruppo “trattato” rispetto al gruppo “controllo” (tabella 1). 8/10 soggetti del gruppo “trattato” e 1/10 del gruppo “controllo” sono risultati positivi per *C. perfringens* tramite real-time PCR a concentrazioni comprese tra  $1,3 \times 10^2$  e  $3 \times 10^4$  UFC/g. Tra questi, *C. perfringens* NetB-positivo è stato isolato da 2 soggetti del gruppo “trattato” e *C. perfringens* NetB-negativo da 1 soggetto del gruppo “controllo”. Negli altri soggetti non è stata rilevata la presenza di *C. perfringens* né tramite esame batteriologico né attraverso real-time PCR. L’esame parassitologico ha dato esito costantemente negativo.

L’ELISA allestito con la tossina rNetB ha permesso di evidenziare buoni titoli anticorpali sia nei soggetti immunizzati per via parenterale con rNetB (OD media = 3.313) che in quelli immunizzati con dNetB+ (OD media = 2.196). Nei soggetti immunizzati con dNetB- la risposta si è attestata su valori decisamente inferiori (OD media = 0.702), ma comunque superiori rispetto al controllo negativo (OD = 0.205). Risultati simili si sono ottenuti anche impiegando il test ELISA allestito con dNetB+, sebbene non si sia dimostrato in grado di discriminare animali immunizzati con dNetB-.

I titoli rilevati nel gruppo infettato sperimentalmente per via orale e nel gruppo “controllo” sono risultati pressoché sovrapponibili, sia con l’ELISA allestito con rNetB che con quello allestito con dNetB+ (figura 1).

## **DISCUSSIONE**

Il protocollo utilizzato per la riproduzione sperimentale della malattia si è rivelato efficace, come dimostrato dalla gravità delle lesioni macroscopiche ed istologiche osservate nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo. La registrazione dei pesi dei polli a 42 giorni di vita evidenzia chiaramente la penalizzazione delle performance zootecniche degli animali causata dall’enterite necrotica, a parità di alimentazione e di condizioni d’allevamento.

Non è stato possibile rilevare una differenza tra i titoli anticorpali del gruppo “trattato” e di quello “controllo” ed entrambi hanno mostrato un andamento anticorpale sovrapponibile. In particolare si è osservato che i pulcini all’arrivano possedevano già titoli anticorpali elevati, probabilmente di origine materna, che sono diminuiti all’inizio della seconda settimana per poi mantenersi costanti fino alla quarta. Dalla quarta settimana i titoli sono aumentati in modo pressoché costante sino al termine della sperimentazione (figura 1). L’innalzamento del titolo anticorpale dopo la quarta settimana può essere spiegato attraverso il contatto con ceppi di campo di *C. perfringens*, anche nel gruppo “controllo”, come evidenziato dalla positività all’esame culturale.

## **CONCLUSIONI**

La riproduzione della malattia attraverso infezione sperimentale per via orale si è dimostrata inadeguata a conferire un titolo anticorpale differenziabile rispetto a quello del gruppo “controllo”. Il test ELISA messo a punto è risultato però in grado di discriminare animali immunizzati per via parenterale. Il test non trova pertanto

applicazioni nello svelare la circolazione di ceppi di *C. perfringens* NetB-positivi in gruppi di broiler, ma potrebbe essere impiegato per valutare la risposta anticorpale in soggetti immunizzati per via parenterale o per studiare la dinamica anticorpale in gruppi di animali che entrino in contatto con il patogeno in condizioni di campo. Dato che la vaccinazione per via parenterale risulta operativamente praticabile solo in gruppi di riproduttori, il titolo anticorpale rilevato nella progenie al primo giorno di vita potrebbe essere utilizzato per studiare quanto questo possa influenzare le prestazioni produttive del gruppo.

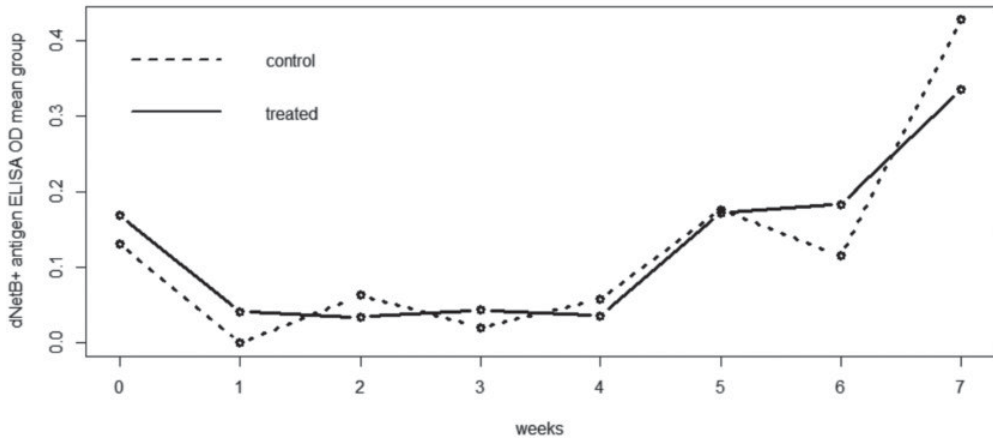
## BIBLIOGRAFIA

1. Keyburn, L., Boyce, J.D, Vaz, P., Bannam., T. L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J. I, Moore, R. J. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: 0001-0011.
2. Keyburn, A. L., Portela, R. W., FordM. E., Bannam T. L., Yan X. X., Rood J. I., Moore R. J. 2013. Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis. *Veterinary Research*, 44:108.
3. Leslie D., Fairweather N., Pickard D., Dougan G., Kehoe M. 1989. Phospholipase C and haemolytic activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin cloned in *Escherichia coli*: sequence and homology with a *Bacillus cereus* phospholipase C. *Molecular Microbiology*, 3(3), 383-392.
4. Shojadoost B., Vince A. R., Prescott J. F. 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Veterinary Research*, 43:74.
5. Wu S. B., Rodgers N., Choct M. 2011. Real-Time PCR Assay for *Clostridium perfringens* in broiler chickens in a challenge model of necrotic enteritis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:1135–1139.

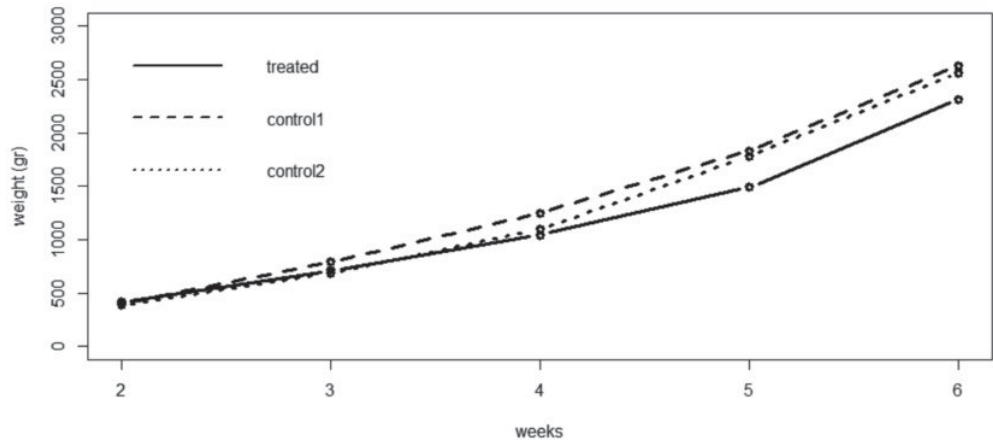
**Tabella 1.** “Lesion score” (LS) attribuiti alle lesioni anatomo-patologiche (LS da 1 a 6) o istopatologiche (LS da 1 a 3) nei 10 soggetti del gruppo “trattato” ed in quelli del gruppo “controllo” sacrificati 10 giorni dopo l’inizio dell’infezione sperimentale.

n°	Lesioni anatomo-patologiche		Lesioni istologiche	
	Controllo	Trattato	Controllo	Trattato
1	0	4	0	3
2	0	4	0	2
3	0	4	1	2
4	0	3	1	2
5	1	4	2	2
6	0	1	1	1
7	0	4	1	3
8	1	5	1	3
9	0	0	1	1
10	3	5	2	3

**Figura 1.** Andamento delle medie dei titoli anticorpali verso l'antigene dNetB+ nei 2 gruppi sperimentali. L'infezione sperimentale del gruppo "treated" è cominciata il 18° giorno di vita ed è terminata il 22°.



**Figura 2.** Incremento ponderale dei gruppi sperimentali, rilevato sino alla sesta settimana. Control 1: gruppo alimentato con mangime commerciale; Control 2: gruppo alimentato con il mangime sperimentale; Treated: gruppo alimentato con il mangime sperimentale e sottoposto a infezione sperimentale con *C. perfringens* NetB+.



## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATI DA TACCHINO

Berto G.<sup>1</sup>, Giovanardi D.<sup>2</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, De Vidi B.<sup>1</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>, Viel L.<sup>1</sup>, Capello K.<sup>3</sup>, Bano L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba, Treviso

<sup>2</sup> Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi 5, 37132 San Michele Extra, Verona

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Epidemiologia Veterinaria, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro

### Summary

One hundred and six *Clostridium perfringens* field strains isolated from turkeys have been toxinogenotyped by PCR protocols previously described. Strains derived from intestines (87), livers (17) and subcutis (2). In addition to the four major toxins, strains have been screened also for NetB, enterotoxin and beta2 toxin encoding genes and the genotype was correlated with gross lesions and the presence of coccidia.

All the isolates resulted toxinotype A and NetB negative. Enterotoxin encoding gene has been detected in 2/106 (1.8%) strains and beta2 in 76/106 (71.6%). The Toxinotype results are consistent with the few published reports concerning genetic characterization of *C. perfringens* of turkey origin. On the contrary, results obtained for NetB and beta2 genes differ substantially from what obtained in other countries where they have been detected only in the 6.6% and in the 0.5% of the tested strains, respectively.

Necrotic enteritis in turkey resulted statistically correlated neither to the genetic virulence factors investigated, nor to the synergistic effect operated by coccidia, even if the majority of birds with NE lesions (68%) tested positive also for these protozoa.

### INTRODUZIONE

L'enterite necrotica (NE) è la patologia ad eziologia clostridica più nota e studiata nel pollo a causa dell'ingente impatto economico da essa determinato, legato al decadimento delle performance zootecniche ed ai costi sostenuti per le terapie dei gruppi colpiti.

L'NE è causata da *Clostridium perfringens*, un bacillo Gram-positivo, anaerobio, sporigeno e ampiamente distribuito nell'ambiente e nell'intestino di uomo e animali. Viene storicamente classificato in 5 tossinotipi (A-E) a seconda della produzione delle tossine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  e  $\iota$  definite "maggiori". Tutti i tossinotipi producono la tossina  $\alpha$  e, in aggiunta a questa, il tossinotipo "B" produce la  $\beta$  e la  $\epsilon$ , il "C" la  $\beta$ , il "D" la  $\epsilon$  e il tossinotipo "E" la  $\iota$ . Sebbene questa classificazione abbia permesso di individuare dei tossinotipi collegati a specifiche malattie dei mammiferi, nel pollame sia i ceppi in grado di produrre NE che quelli apatogeni appartengono unicamente al tossinotipo "A" (Keyburn *et al.*, 2006).

Tra i fattori di virulenza prodotti da *C. perfringens* responsabili di patologie

dell'apparato gastroenterico, vi sono la tossina  $\beta 2$  e l'enterotossina. La prima sembra rivestire un ruolo importante nell'enterite necrotica del suino (Klasen *et al.*, 1999), nell'enterocolite del cavallo (Herholz *et al.*, 1999) e nell'enterotossinemia del bovino (Manteca *et al.*, 2002), mentre l'enterotossina è associata principalmente a casi di tossinfezione alimentare nell'uomo (Brynstad and Granum, 2002).

Nello studio dell'NE del pollo si è giunti ad individuare una "pore forming toxin" denominata NetB, che oggi appare fortemente coinvolta nella patogenesi della malattia (Keyburn *et al.*, 2008). In uno studio effettuato in Italia il gene codificante questa tossina (*netB*), è stato evidenziato in circa il 93% dei ceppi isolati da polli con NE (Drigo *et al.*, 2009), mentre in uno studio analogo condotto sul tacchino, non era stata individuata in nessuno dei 25 ceppi testati (Saita *et al.*, 2009). Gli studi di tossinotipizzazione eseguiti su ceppi di *C. perfringens* isolati da tacchino non sono molti, e riguardano prevalentemente ceppi provenienti da campioni di carne prelevata direttamente nei punti vendita (Erol *et al.*, 2008; Aras *et al.*, 2015). In tali lavori tutti i ceppi isolati appartenevano al solo tossinotipo "A" e veniva segnalata la sporadica presenza anche del gene codificante l'enterotossina mentre la tossina NetB e beta2 non erano state indagate.

In un lavoro condotto in allevamenti di tacchini era stato ricercato sia il gene *netB* che quello codificante la tossina beta2 (*cpb2*). Il primo era stato rilevato nel 6,6% (tutti i soggetti con NE) e il secondo nello 0,5 dei ceppi testati (n° 212) (Lyhs *et al.*, 2013).

Nel presente studio vengono riportati i dati di caratterizzazione molecolare di ceppi di *C. perfringens* isolati da tacchini commerciali. I dati ottenuti da soggetti con lesioni dell'apparato gastroenterico sono stati messi in relazione alla gravità delle lesioni osservate e alla presenza di coccidi.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

L'indagine ha riguardato 106 ceppi di *C. perfringens* isolati tra il 2006 e il 2015 da 88 tacchini da carne e 23 riproduttori conferiti presso il laboratorio diagnostico per i consueti accertamenti.

I soggetti avevano un'età compresa tra 1 e 55 settimane ed erano stati selezionati sulla base di manifestazioni diarroiche e/o anomalo aumento della mortalità, osservati in allevamenti diversi o in cicli produttivi diversi.

Gli isolamenti erano stati ottenuti da organi/tessuti con lesioni macroscopicamente evidenti. In particolare: 87 ceppi erano stati isolati da tratti intestinali interessati da enterite (catarrale o necrotica), 17 da fegati con lipidosi/degenerazione epatica, 2 da essudato sottocutaneo di soggetti con dermatite gangrenosa.

I contenuti intestinali, i fegati e il liquido siero emorragico sottocutaneo sono stati seminati singolarmente in terreno agarizzato addizionato con sangue di montone al 5 % (OXOID). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore in condizioni di anaerobiosi. L'identificazione su base biochimica è stata ottenuta impiegando la galleria miniaturizzata rapid ID 32 A (bioMérieux).

### *Accertamenti diagnostici collaterali*



In presenza di lesioni dell'apparato gastroenterico si era proceduto alla valutazione semiquantitativa delle oocisti coccidiche attraverso l'osservazione microscopica (100X) diretta del raschiato intestinale. In base al numero di oocisti presenti in ciascun campo visivo, il grado di parassitosi coccidica era stato classificato in 3 categorie: grado 1 (1-10 oocisti), grado 2 (11-50 oocisti), grado 3 (> 50 oocisti).

#### *Caratterizzazione molecolare*

I ceppi di *C. perfringens* sono stati sottoposti ad estrazione automatica del DNA attraverso il kit Mag Max Total Nucleic Acid Extraction Kit (Ambion).

Si è quindi proceduto alla tossinotipizzazione degli isolati ricercando i geni *cpa*, *cpb1*, *cpetx*, e *cpi* codificanti rispettivamente le tossine maggiori  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ . Inoltre è stata ricercata la presenza dei geni codificanti l'enterotossina (*cpe*), la tossina NetB (*netB*) e la tossina  $\beta_2$  (*cpb2*) utilizzando protocolli di PCR pubblicati (Yoo *et al.*, 1997; Garmony *et al.*, 2000; Baums *et al.*, 2004; Keyburn *et al.*, 2006). I ceppi di *C. perfringens* di riferimento utilizzati come controllo positivo per i geni target indagati sono stati: ATCC 27324 (tossinotipo E + enterotossina), CCUG 2036 (tossinotipo C), CCUG 2037 (tossinotipo D), ATCC 10543 (tossinotipo A+ b2).

Come controllo positivo per il gene *netB* è stato utilizzato il ceppo cortesemente fornito dal Prof. Van Immerseel (Università di Ghent), confermato mediante sequenziamento dell'amplificato.

#### *Analisi statistica*

Il test di Fisher è stato applicato per studiare possibili associazioni tra NE e i gradi 2 e 3 di infestazione coccidica. Lo stesso test è stato utilizzato per indagare possibili correlazioni tra la gravità del quadro gastroenterico osservato e l'infezione da parte di ceppi *cpb2*-positivi.

## **RISULTATI**

Tutti gli isolati appartenevano al tossinotipo A, 76/106 sono risultati *cpb2* positivi e 2 erano positivi anche al gene *cpe*. La positività a *cpb2* non è risultata significativamente associata alla gravità della lesione (enterite catarrale vs necrotica). Nessun ceppo è risultato *netB* positivo.

La presenza di coccidi è stata rilevata in tacchini d'età compresa tra 21 e 98 giorni, e solo in soggetti da carne, con le infestazioni più gravi (score "3") riscontrate tra il 22° e il 35° giorno di vita. Sebbene la presenza di coccidi sia stata osservata in un maggior numero di soggetti con NE rispetto a quelli con enterite catarrale (68% vs 32%), tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa, nemmeno considerando i diversi gradi di coccidiosi.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il risultato di tossinotipizzazione ottenuto è in accordo con quanto già riportato in altri studi condotti su ceppi di *C. perfringens* isolati da tacchino in cui era stato rilevato il solo tossinotipo "A" (Erol *et al.*, 2008; Saita *et al.*, 2008; Lyhs *et al.*, 2013; Aras and Hadimli, 2015).

Le differenze maggiori riguardano principalmente il gene *cpb2* che, in uno studio

condotto su 212 *C. perfringens* isolati da tacchini, era stato rilevato solo in 1 ceppo (Lyhs *et al.*, 2013). E' possibile che la discordanza dei risultati ottenuti nel nostro studio rispetto a quelli di Lyhs e coll. (2013) sia imputabile al differente protocollo di PCR da noi adottato (Garmory *et al.*, 2000); d'altra parte quest'ultimo si era dimostrato capace di individuare alcuni ceppi di referenza *cpb2* positivi, come anche confermato dal successivo sequenziamento genico, non rilevati, invece, con il protocollo proposto da Baums nel 2004 (3).

Il gene *cpb2* non è risultato significativamente correlato alla gravità della lesione osservata macroscopicamente ed è stato rilevato anche in ceppi isolati da fegato e muscolo di soggetti non interessati da sintomatologia enterica. Questo lascia sospettare un ruolo marginale della tossina  $\beta_2$  nelle forme enteriche del tacchino.

Nel presente studio il gene *netB* non è stato rilevato in alcun ceppo mentre nella ricerca condotta su ceppi finlandesi di tacchino il 6,6% era risultato *netB*-positivo e tali ceppi erano stati isolati tutti da soggetti con NE (Lyhs *et al.*, 2013). Anche in quello studio non tutti i ceppi isolati da NE erano risultati *netB*-positivi, lasciando ipotizzare l'implicazione di altri fattori di virulenza, forse non ancora noti, nell'eziopatogenesi dell'NE del tacchino. Come nel pollo anche nel tacchino non si esclude che fattori predisponenti alimentari, parassitari o immunodepressivi (es. adenovirus dell'enterite emorragica) possano agire sinergicamente a *C. perfringens* e causare l'NE.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aras Z., Hadimli H. H. 2015. Detection and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from beef, chicken and turkey meats. *Anaerobe* 32, 15-17.
2. from beef, chicken and turkey meats
3. Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin-genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 100:11-16.
4. Brynestad S., Granum P. E. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* 74, 195– 202.
5. Drigo, I, Agnoletti, F., Bacchin, C., Bettini, F., Cocchi, M., Ferro, T., Marcon, B., Bano, L., 2008. Toxin-genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. *Ital J. Anim. Sci.* 7: 397-400.
6. Erol I., Goncuoglu M., Ayaz N. D., Bilir Ormanci F. S., Hildebrandt G. 2008. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Letters in Applied Microbiology* 47, 31–34.
7. Garmory HS, Chanter N, French NP, Bueschel D, Songer JG, Titball RW. 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens*  $\beta_2$ -toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect.*, 124, 61-67.
8. Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M.R., Gibert, M., Gerber, H., Straub, R., 1999. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.* 37, 358–361.
9. Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E, Williamson, M.M., Award, M.M, Rood, J.I., Moore, R.J., 2006. Alpha Toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74:6496-6500.

10. Keyburn, L., Boyce, J.D, Vaz, P., Bannam., T. L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J. I, Moore, R. J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: 0001-0011.
11. Klaasen, H.L.B.M., Molkenboer, M.J.C.H., Bakker, J., Miserez, R., Hani, H., Frey, J., Popoff, M.R., van den Bosch, J.F., 1999. Detection of the beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrheic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24, 325–332.
12. Lyhs U., Perko-Mäkelä P., Kallio H., Brockmann A., Heinikainen S., Tuuri H., Pedersen K. 2013. Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poultry Science* 92 :1750–1757.
13. Manteca, C., Daube, G., Jauniaux, T., Linden, A., Pirson, V., Dettileux, J., Ginter, A., Coppe, P., Kaeckenbeeck, A., Mainil, J.G., 2002. The role of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in bovine enterotoxemia? *Vet. Microbiol.* 86, 191–202.
14. Saita, M., Bano, L., Gallazzi, D., 2008. Pathogenicity markers of *Clostridium* spp. in commercial turkeys. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 8, 781-784.
15. Yoo, H. S., Lee, S. U., Park, K.Y., Park, Y. H., 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35:228-232.

## APPLICAZIONE DI MODELLI DI VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI MONOGLICERIDI DEGLI ACIDI GRASSI A CORTA E MEDIA CATENA NEI CONFRONTI DI *SALMONELLA* SPP.

Bilato D.\*, Tosi G.\*, Parini M.§, Paoli A.§, Fiorentini L.\*, Cantini F.§, Massi P.\*, Amadori M.\*.

\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Italia  
§ Silo S.p.A., Firenze, Italia

### Summary

Antibiotic resistance and, in particular, the generation of multidrug resistant bacteria among zoonotic agents highlights the importance to develop research on new disease control strategies on farm. In this scenario, organic acid monoglycerides proved to be valid products in terms of antibacterial potency, cost-benefit profile and absence of withdrawal periods. In order to define reliable parameters of efficacy, an integrated potency score of such monoglycerides was developed *in vitro* in *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* (SE) and *S. typhimurium* (ST) models, based on inhibition of bacterial growth in medium, inhibition of intracellular invasion in Porcine Jejunal Epithelial Cells (IPEC-J2), and a killing test evaluated by flow cytometry. The above tests enabled us to detect significant differences in the activity of some monoglycerides. Results indicate that our panel of tests can be the foundation of a potency score system. This could be adopted to select proper monoglycerides for field trials in the target species. Further studies *in vivo* are necessary to confirm the predictive data *in vitro*. Moreover, the impact of monoglycerides on the innate and adaptive immune system and the development of assays on cell lines of poultry origin for pro-inflammatory cytokines should be further investigated.

### INTRODUZIONE

Lo sviluppo dell'antibiotico resistenza, ed in particolare di multi-resistenze di batteri zoonosici, ha evidenziato l'importanza di sviluppare nuove strategie di controllo delle infezioni microbiche. Tali strategie sono state discusse all'OIE/IABS international conference on "Alternatives to antibiotics" (OIE/IABS, 2012) e al 3rd International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals (BASTIANSEE, 2014). Nell'ambito di queste varie strategie, gli acidi organici a corta e media catena hanno dimostrato sia *in vivo* che *in vitro* attività antimicrobica verso diversi agenti microbici, in particolare l'acido butirrico e caprilico (Kabara *et al.*, 1972; Hilmarsson *et al.*, 2006; Thormar *et al.*, 2007). Diversi vantaggi, come l'aumento delle *performance*, miglioramento della qualità delle carcasse, diminuzione della colonizzazione intestinale, ed effetti trofici sulla mucosa intestinale sono stati riportati (Leeson *et al.*, 2005). Inoltre, effetti secondari sul sistema immunitario hanno evidenziato una *down regulation* dell'espressione dei geni implicati nella invasione intestinale, in particolare della SPI-1 di *Salmonella* spp. (Gantois *et al.*, 2006) e sulla espressione di citochine pro-infiammatorie (Zhang

*et al.*, 2011). L'obiettivo del presente lavoro è stata la valutazione di uno *score* di potenza *in vitro* di questi prodotti nei confronti di ceppi di SE e ST aviari, mediante un sistema integrato basato sulla inibizione della crescita batterica, sulla determinazione dell'invasione di cellule IPEC-J2 e test di *killing* batterico valutato mediante citofluorimetria a flusso.

## **MATERIALI E METODI**

### *Identificazione dei monogliceridi*

Sono stati utilizzati 6 monogliceridi di acidi organici identificati come M1, M2, M3, M4, M5, M6, di proprietà brevettuale di SILO S.p.A.

### *Ceppi batterici*

Sono stati utilizzati 4 ceppi di SE, 4 di ST, di cui 3 di variante monofasica. I ceppi sono stati coltivati in terreno Luria-Bertani (LB) in fase stazionaria e incubati a + 37°C per 18 h. Prima dell'utilizzo, le sospensioni venivano misurate a 600 nm con Biochrom Biowave Cell Density Meter WPA CO8000 al fine di allestire le diluizioni per i relativi test secondo una curva standard.

### *Turbidimetria*

I monogliceridi sono stati allestiti in LB in diluizioni seriali. I ceppi di Salmonella diluiti 1:500 sono stati inoculati in 6 mL di LB con differenti concentrazioni di monogliceride per 18 h a + 37°C in fase stazionaria. La relativa concentrazione batterica ed *end point* finale di attività dei monogliceridi sono state calcolate a 600 nm attraverso una curva standard.

### *Cellule IPEC-J2 e invasione batterica*

Per la prova di invasione cellulare sono state utilizzate cellule IPEC-J2 (IZSLER Cell Bank code BS CL 205), mantenute in 1:1 DMEM/F12 con il 10% di siero fetale bovino e senza l'aggiunta di antibiotici. Sono state utilizzate piastre da 12 pozzetti, incubate a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> per 24 h ai fini di ottenere un monostrato confluento con approssimativamente 5x10<sup>5</sup> cellule/pozzetto. La sospensione batterica è stata centrifugata e risospesa in DMEM/F12 senza antibiotici. In seguito è stata diluita ad una densità di 1x10<sup>8</sup> cfu/mL con e senza monogliceridi per 1 h a RT, previo allestimento degli stessi in DMEM/F12. Brevemente, il monostrato confluento di IPEC-J2 è stato incubato con 1 ml di sospensione batterica di controllo e di sospensione batterica/monogliceridi per 1 h a + 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. In seguito, tale monostrato è stato incubato per 2 h a 37°C con 1 mL of 300 g/mL di colistina per eliminare i batteri extracellulari e successivamente lisato in Triton X-100 in PBS. Il lisato è stato diluito serialmente in PBS fino a 10<sup>-5</sup>. 100 µl di ogni diluizione sono stati piastrati in Trypticase Soy Agar e incubati a 37 °C per 18-24 h. Il numero di batteri intracellulari è stato valutato mediante calcolo di media bilanciata.

### *Test di killing*

I monogliceridi sono stati allestiti in NaCl allo 0,85%. A partire da una sospensione

*overnight* di *Salmonella* spp., i ceppi sono stati incubati a 37°C per 2 h con i monogliceridi. La vitalità batterica è stata determinata mediante citofluorimetria a flusso utilizzando opportune modifiche del kit Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability and Counting (L34856) Molecular Probes®, su 20000 eventi.

## RISULTATI

I risultati hanno evidenziato nei diversi test differenze significative di attività tra monogliceridi, come riassunto in tabella 1.

**Tabella 1. Monogliceride con attività più elevata nei diversi saggi**

Turbidimetria				Invasività		
Ceppo	%	% inibizione	P	%	% inibizione	P
SE1	M4 0,1%	42,3	0,0078	M4 0,2%	100	0,0092
SE2	M4 0,1%	49,5		M4 0,2%	100	
SE3	M4 0,1%	25,7		M4 0,2%	100	
ST1	*M6 0,02%	*2,6	*0.4  0,0005	*M5 0,05%	*95,27	*<0,0001  0,0067
	M2 0,2%	32,8		M1 0,2%	61,03	
ST2	*M4 0,02%	*35,9		*M5 0,05%	*62,2	
	M2 0,2%	59,5		M2 0,2%	50,26	
ST3	*M6 0,02%	*15,3	*M5 0,05%	*99,85		
	M2 0,2%	50	M2 0,2%	99,6		
ST4	*M5 0,02%	*22,7	*M5 0,05%	*73,6		
	M2 0,2%	42,8	M2 0,2%	71,43		

I dati ottenuti nei saggi sopra descritti sono stati controllati per normalità e sottoposti ad analisi della varianza con procedura parametrica e *t-test*, mentre le percentuali di *killing* sono state analizzate con test chi-quadrato in tabella di contingenza 2X2, come riportato nella tabella 2.

**Tabella 2. Test di *killing***

Ceppo - % Monogliceride	% Inibizione	P
SE1-M4 0,2%	34,2	<0,0001
SE2-M4 0,2%	12	<0,0001
SE3-M4 0,2%	13,3	<0,0001
SE4-M4 0,2%	18,2	<0,0001
ST1-M6 0,05%	11,1	<0,0001
ST2-M6 0,05%	26,7	<0,0001
ST3-M6 0,05%	4,2	<0,0001
ST4-M6 0,05%	11,5	<0,0001

**Tabella 3. *Score***

<i>Score</i>	Turbidimetria	Invasione	<i>Killing</i>
0	<1%	<1 %	< 1%
1	1-10%	1-25%	1-25%
2	10-20%	25-50%	25-50%
3	20-30%	50-75%	50-75%
4	>30	>75	>75

Sulla base dello *score* attribuito considerando una scala da 0 a 4, come descritto in tabella 3, per SE è stato evidenziato uno score di 8,5 per M4 rispetto a 5 per M1. Per ST è stata rilevata una maggiore attività di M2 (7,5) rispetto a M1 (5,75) e M3 (4,75) allo 0,2% ed una maggiore attività di M6 (6,75) rispetto a M5 (5,5) e M4 (4,75) alla concentrazione di 0,05%.

## DISCUSSIONE

Lo sviluppo dell'antibiotico resistenza, ed in particolare di multiresistenze di batteri agenti di zoonosi, ha sottolineato l'importanza di un uso responsabile degli antibiotici negli animali a produzione zootecnica insieme alla necessità di sviluppare nuove e diverse strategie di controllo. Nell'ambito di tali strategie, i monogliceridi hanno dimostrato attività antibatterica verso ceppi di SE e ST, agendo in particolare sulla diminuzione dell'invasione cellulare. Inoltre, caratteristiche peculiari di questi prodotti quali un rapporto costo-beneficio favorevole, assenza di tempi di sospensione, palatabilità, e soprattutto la stabilità termica ed indipendenza dal pH, li rende biodisponibili in diversi ambienti come gozzo, stomaco, intestino e quindi utilizzabili su larga scala come supplemento del mangime o acqua di bevanda. Tali composti non rappresentano ovviamente una *panacea* ma dovrebbero essere opportunamente combinati nell'ambito di una corretta gestione aziendale e terapeutica insieme a strategie di prevenzione imperniata sulla biosicurezza e profilassi vaccinale.

## CONCLUSIONI

I risultati dimostrano che i monogliceridi possono avere un effetto antibatterico, diverso in funzione dell'acido utilizzato e della dose d'impiego, e che il sistema di *score* in oggetto può permettere di selezionare i composti più idonei per prove di campo nelle specie di interesse. Sulla base del nostro *score*, alcuni monogliceridi si sono infatti rilevati più attivi di altri. Tale approccio di natura metodologica potrà essere applicato anche verso altri prodotti ad attività antibatterica. Prove *in vivo* saranno necessarie a confermare le prove eseguite *in vitro*, insieme alla valutazione approfondita dell'impatto sul sistema immunitario mediante ad esempio saggi di citochine infiammatorie. Inoltre, linee cellulari di enterociti di pollo saranno utili per meglio comprendere il meccanismo di azione di tali composti.



## **BIBLIOGRAFIA**

1. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC and Van Immerseel F (2006). Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol.* 72(1): 946-949.
2. Hilmarsoon H, Thormar H, Thrainsson JH and Gunnarsson E (2006). Effect of Glycerol Monocaprate (Monocaprin) on Broiler Chickens: An Attempt at reducing Intestinal Campylobacter Infection *Poult Sci.* 85(4): 588-592.
3. Leeson S, Namkung H, Antongiovanni M and Lee EH. (2005). Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poult Sci.* 84(9): 1418-1422.
4. Thormar H, Hilmarsson H and Bergsson G. (2007). Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli*. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 91(7-8): 312-318.
5. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ and Truant JP (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2(1): 23-28.
6. Zhang WH, Jiang Y, Zhu QF, Gao F, Dai SF, Chen J and Zhou GH (2011). Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. *Br Poult Sci.* 52(3): 292-301.

## VALUTAZIONE DI ANTIBIOTICO RESISTENZA E PROFILO GENETICO DI *CAMPYLOBACTER* SPP. TERMOFILII ISOLATI DA POLLI BROILER

Casagrande Proietti P.<sup>1</sup>, De Luca S.<sup>1</sup>, Comitini F.<sup>2</sup>, Pergola S.<sup>2</sup>, Galli R.<sup>3</sup>, Marenzoni M.L.<sup>1</sup>, Franciosini M.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Via san Costanzo 4 Perugia 06100,

<sup>2</sup> Università Politecnica delle Marche Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente via Brecce Bianche Ancona 60131,

<sup>3</sup> Fileni SIMAR SRL Località Cerrete Collicelli N° 8 -Cingoli (MC) 62011

### Summary

Infection with *Campylobacter jejuni* is considered the most common cause of acute bacterial gastroenteritis in humans worldwide. In general, the occurrence of human *Campylobacter* gastroenteritis has been largely attributed to the consumption of contaminated food animal products, especially poultry, because of the high prevalence of *Campylobacter* in these animals. The aim of this investigation was to determine the antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens during productive cycle and at slaughter by the method of broth microdilution plate. Susceptibility towards ampicillin, cephalosporins and imipemem was also evaluated by the disk diffusion methods. The antimicrobial susceptibility pattern of *C. coli* isolates was similar for all strains since they showed fluoroquinolone resistance (ciprofloxacin and nalidixic acid) and susceptibility toward chloramphenicol and aminoglycosides (gentamycin and streptomycin). Only the isolates from a farm were resistant to erythromycin. Differences were also seen in the *C.jejuni* isolates from two different farms since in one they were resistant to streptomycin and in the other one was susceptible to tetracycline. All thermophilic *Campylobacter* spp. were resistant to ampicillin and to cephalosporins. Genotyping by the SAFLP (single-enzyme amplified fragment length polymorphism) revealed homologous fingerprint for the isolates of *Campylobacter coli* e *jejuni* within the same farm while it was dissimilar when compared to genotypic fingerprints coming from the other farms. This could support the hypothesis of clonal expansion of the strains within the same area.

### INTRODUZIONE

*Campylobacter* spp. è considerato, a livello mondiale, tra i principale agenti batterici responsabili di tossinfezioni [14]. Le specie più comunemente associate ad infezione e malattia nell'uomo sono rappresentate da *C. jejuni*, seguito da *C. coli* e *C. lari* [4]. Il consumo di alimenti di origine animale, in particolar modo prodotti avicoli, costituiscono la principale sorgente di infezione umana [1]. Oltre alle potenzialità zoonotiche, l'importanza che tale batterio riveste per la Sanità Pubblica è dovuta alla sua capacità di resistere alla maggior parte di antibiotici impiegati in medicina umana e veterinaria. Numerosi sono infatti gli episodi di resistenza riportati nei confronti di tetracicline, eritromicina, fluorochinoloni, beta-lattamici [16,12,13]. Obiettivo del lavoro è stato quello di valutare, in ceppi di *C. jejuni* e *C.coli*, isolati da polli broiler in allevamento e alla macellazione, il profilo genetico e la suscettibilità nei confronti alcuni antibiotici.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Un totale di 110 ceppi di *Campylobacter* spp. sono stati isolati da 85 tamponi cloacali e da 25 campioni cutanei di carcasse di polli broiler. in un periodo compreso tra Luglio e Ottobre 2014. I tamponi cloacali sono stati effettuati in 5 allevamenti commerciali localizzati in Umbria, mentre i campioni di cute sono stati prelevati al macello nelle partite provenienti dagli allevamenti esaminati.

### *Isolamento e Identificazione*

L'isolamento di *Campylobacter* spp. è stato eseguito utilizzando terreni di arricchimento (*Campylobacter* Bolton Enrichment Broth Base con sangue lisato di cavallo e Bolton Broth Selective Supplement) e un terreno selettivo (mCCDA-Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar). Le piastre sono state incubate a 42°C per 48 ore in condizione di microaerofilia. I ceppi di *Campylobacter* spp. sono stati identificati mediante multiplex PCR [17]. I ceppi utilizzati come controlli positivi sono stati *C. coli* NCTC 11353, *C. fetus* subsp.fetus ATCC 27374, *C. jejuni* ATCC 33291, *C. upsaliensis* NCTC 11541 e *C. lari* NCTC 11552. I ceppi identificati come *C.jejuni* e *C.coli* sono stati tipizzati con la tecnica SAFLP (single-enzyme amplified fragment length polymorphism) come descritto da Champion et al.[2]

### *Determinazione della suscettibilità agli antimicrobici*

La suscettibilità agli antibiotici dei ceppi di *Campylobacter* spp. è stata valutata mediante determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) utilizzando il metodo della microdiluzione in brodo su piastra (Eucamp, Thermofisher). Brevemente, un inoculo di  $5 \times 10^5$  batteri è stato versato in provette contenenti Muller-Hinton broth arricchito con sangue lisato di cavallo (Oxoid) e distribuito in piastre contenenti concentrazioni scalari note dei seguenti antibiotici: gentamicina (0.12–16 µg/mL), streptomina (1–16 µg/mL), ciprofloxacina (0.06–4 µg/mL), tetraciclina (0.25–16 µg/mL), eritromicina (0.5–32 µg/mL), acido nalidixico (2–64 µg/mL) e cloramfenicolo (2–32 µg/mL). Le piastre sono state incubate a 37° C per 48h in condizioni di microaerofilia e successivamente sottoposte a lettura manuale. *C. jejuni* NTCC 11351 è stato utilizzato come controllo positivo. I risultati concernenti cloramfenicolo sono stati valutati in accordo ai criteri interpretativi della Società francese di Microbiologia mentre per gli altri sono stati utilizzati i breakpoints stabiliti dall'EUCAST per *Campylobacter* spp. E' stata determinata inoltre la suscettibilità ad alcuni antibiotici beta-lattamici quali ampicillina (AMP) 10µg, cefalessina (CL) 30µg, cefoxitina(FOX) 30µg, cefotaxime (CTX) 30µg, cefepime (FEP) 30µg e imipemem (IMP) 10µg, mediante il metodo di diffusione su piastra. I risultati concernenti ampicillina e cefotaxime sono stati valutati in accordo ai criteri interpretativi della Società francese di Microbiologia mentre per cefalessina, cefoxitina, cefepime e imipinem sono stati utilizzati i breakpoints stabiliti dall'EUCAST per gli Enterobatteri poiché per *Campylobacter* spp. non sono disponibili breakpoints specifici in riferimento a tali antibiotici.

## Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando i test  $\chi^2$ , il test F di Fisher e il test Kruskal-Wallis, in base al tipo di variabili analizzate, fissando una  $P < 0.05$  come statisticamente significativa.

## RISULTATI

La Multiplex PCR ha permesso di identificare 88 ceppi di *C. coli* (80%) di cui 25 isolati dalla cute e 22 ceppi di *C. jejuni*. (20%). In tre dei cinque allevamenti sono stati isolati solo *C. coli*, in uno sia *C. coli* che *C. jejuni* mentre in un allevamento solo ceppi di *C. jejuni*. La tipizzazione genomica eseguita mediante SAFLP-PCR ha consentito di evidenziare, sia per *C. jejuni* che per *C. coli*, genotipi differenti nei diversi allevamenti mentre ceppi di uno stesso allevamento sono risultati appartenere allo stesso genotipo. I profili di antibiotico resistenza valutati mediante metodo di micro - diluizione in brodo sono riportati nelle tabelle 1 e 2. In riferimento al profilo di suscettibilità antibiotica valutata su agar- diffusione in piastra si evince che la maggior parte dei ceppi di *C. coli* e *C. jejuni* è resistente a ampicillina e cefalosporine (1°, 2°, 3° generazione), mentre tutti sono risultati sensibili a cefepime (4° generazione) e imipenem (Tab. 3 e 4) Considerando i ceppi esaminati, 107 (97,2%) sono risultati essere multiresistenti, in quanto si sono mostrati resistenti nei confronti di almeno tre classi di antibiotici (tab.5 )

## DISCUSSIONE

Il problema dell'antibiotico resistenza derivato da batteri presenti in alimenti di origine animale sta acquistando sempre più importanza nell'ambito della Sanità Pubblica anche nei Paesi in via di sviluppo [10]. Un numero sempre più elevato di ceppi di *Campylobacter* spp. antibiotico-resistenti sono isolati dal pollame; le forme di resistenza di maggiore riscontro sono rappresentate da quelle nei confronti di fluorochinoloni, aminoglicosidi, tetracicline e in minor misura macrolidi [3]. Nella nostra indagine la tipizzazione genomica eseguita mediante SAFLP-PCR ha consentito di evidenziare, sia per *C. jejuni* che per *C. coli*, genotipi differenti nei diversi allevamenti, tuttavia è stato osservato che tutti i ceppi isolati da uno stesso allevamento appartengono allo stesso biotipo. E' da sottolineare che in relazione ai ceppi di *C. coli*, nonostante i genotipi differenti nei diversi allevamenti il profilo dell'antibiotico -resistenza, valutato tramite micro-diluizione in brodo, ha dato risultati sovrapponibili in tutti gli allevamenti, in quanto il 100% degli isolati è risultato resistente a ciprofloxacina, acido nalidixico e tetraciclina e sensibile a gentamicina, streptomina, cloramfenicolo e eritromicina, ad eccezione degli isolati di un unico allevamento che hanno presentato resistenza a questo ultimo antibiotico ( $P < 0,001$ ). Per quanto riguarda invece *C. jejuni*, nei due allevamenti in cui è stato isolato, sono stati identificati due genotipi diversi che hanno mostrato differenti profili di antibiotico resistenza. I ceppi di un allevamento sono, infatti, risultati sensibili a tutti gli antibiotici ad eccezione della streptomina ( $P < 0,001$ ), mentre negli isolati dall'altro è stata osservata resistenza ad acido nalidixico ( $P < 0,001$ ) e ciprofloxacina ( $P < 0,001$ ). Dai nostri risultati è emerso che *C. jejuni* e *C. coli* hanno mostrato percentuali elevate di resistenza ai chinoloni., analogamente a quanto riportato dai dati bibliografici [6,18]. In questo caso un ruolo determinante è stato giocato

dalla pressione esercitata dal largo uso terapeutico, spesso inadeguato di tali farmaci che potrebbe aver favorito la selezione non di uno ma più cloni di *Campylobacter* resistenti [9]. E' emerso, inoltre, dai nostri dati, che differenze tra le 2 specie sono state osservate per quanto concerne la risposta a tetraciclina e streptomina; infatti contrariamente a *C.coli*, *C.jejuni* ha mostrato sensibilità verso la prima ( $P<0,001$ ) e resistenza nei confronti della seconda ( $P<0,001$ ). I dati riferibili alla tetraciclina si discostano da risultati ottenuti in altri lavori [3,7] in cui *Campylobacter* spp. mostra livelli di suscettibilità minori; infatti la percentuale di ceppi di *C.jejuni* sensibili, riscontrati nella nostra indagine, è stata pari al 77,27%. E' da notare, che sebbene l'uso di tetraciclina si sia ridotto in questi ultimi anni, i fenomeni di resistenza nei confronti di questo antimicrobico da parte di germi isolati da prodotti di origine animale [5] sono comuni. Per quanto riguarda la streptomina, i ceppi di *C.jejuni* hanno mostrato percentuali di resistenza pari al 18,1%, con differenze statisticamente significative tra i 2 allevamenti ( $P<0,001$ ). E' comunque da sottolineare che nella nostra area questo gruppo di farmaci viene poco impiegato nell'allevamento del pollo da carne. A dispetto del largo uso dei macrolidi in campo, gli isolati di *Campylobacter* spp. nel nostro studio sono apparsi perlopiù sensibili a eritromicina, conformemente alla maggior parte dei dati riportati in bibliografia [12,18], sebbene alcuni stipiti di *C.coli* provenienti da un allevamento siano risultati resistenti a eritromicina. E' da considerare inoltre che in questo microrganismo l'instaurarsi di resistenza nei confronti dei macrolidi è un meccanismo complesso e non veloce come quello che si verifica nel caso dei fluorochinoloni [12]. Nel nostro lavoro, inoltre, alte percentuali di resistenza sono state osservate per *C.jejuni* e *C.coli* nei confronti di cefalosporine di 1°, 2° e 3° generazione, in accordo con i dati riportati da Giacomelli et al. [7]. Una differenza statisticamente significativa ( $P<0,0001$ ) si è osservata per quanto riguarda la risposta alla ampicillina in quanto le percentuali di sensibilità sono state pari a 31,8% e 2,4 % rispettivamente per *C.jejuni* e *C.coli*. Va comunque specificato che tali batteri in genere sono resistenti naturalmente all'azione dei beta lattamici, in quanto produttori di beta lattamasi [15], sebbene tutti i meccanismi che mediano questa forma di resistenza siano ben lungi dall'essere chiariti [11]. Infine il 97,2% dei ceppi esaminati è risultato essere multiresistente con un pattern maggiormente rappresentato da chinolonici-tetracicline-penicilline-cefalosporine.

## CONCLUSIONI

I risultati relativi a antibiotico-resistenza, pur conformi a quanto riportato in bibliografia [3,7], hanno messo in evidenza delle peculiarità di comportamento di *C.jejuni* e *C.coli* nei confronti di alcuni antibiotici. Il fingerprinting genetico ha rivelato l'esistenza di profili genetici uguali nello stesso allevamento, portando ad ipotizzare l'esistenza di fenomeni di espansione clonale degli isolati di *Campylobacter* nell'ambito di una medesima area, come precedentemente riportato da Jonker e Pikard [8]. In conformità a dati precedentemente riportati in letteratura [8], i ceppi di *C.jejuni* e *C.coli* si sono mostrati sensibili solo nei confronti di beta lattamici di 4° generazione e a imipenem.

## BIBLIOGRAFIA

1. Acha PN, B Szyfres. (2003). Campylobacteriosis. In : Pan American Health Organization, (III ed). Washington DC: Zoonoses and Communicable Diseases-

- es Common to Man and Animals. Bacterioses and Mycoses. pp 67–72.
2. Champion OL, Best EL and JA Frost . (2002). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to
  3. Di Giannatale E., Di Serafino G, Zilli k , Alessiani A, Saccini L, Garofalo G, Aprea G and F Marotta. (2014). Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy. *Sensors*. 14(2): 3308–22.
  4. EFSA. (2009). *Campylobacter* in: *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in The European Union in 2007*, pp 109-133.
  5. EFSA(2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain .*The EFSA J*.9:2105.
  6. Gaudreau C , G Huguette. (2003) Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from humans in 1998 to 2001 in Montréal, Canada. *Antimicrob.Agents Chemother*. 47: 2027–2029.
  7. Giacomelli M, Salata C, Martini M, Montesissa C and A Piccirillo.(2014) Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microb Drug Resist* 20:181-188.
  8. Jonker A, JAPicard. (2010). Antimicrobial susceptibility in thermophilic *Campylobacter* species isolated from pigs and chickens in South Africa. *Tydskr. S.Afr.vet.Ver*.81:228-236.
  9. Humphrey TJ, Jørgensen F, Frost JA,Wadda H, Domingue G, Elviss NC, Griggs DJ and LJV Piddock.( 2005). Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in commercial poultry flocks before, during, and after treatment with fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother*.49:690–698.
  10. Isenbarger DW, Hoge CW, Srijan A, Pitarangsi C, Vithayasai N, Bodhidatta L, Hickey KW and PD Cam. (2002).Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996–1999. *Emerg. Infect. Dis*.8: 175–180.
  11. Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F and LA Larivitre.(1991). Role of the  $\beta$ -lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to  $\beta$ -lactam agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 35: 813–818.
  12. Luangtongkum T, Morishita TY, Ison AJ, Huang S, Mcdermott PF, Zhang Q (2006). Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl. Environ. Microbiol*.72: 3600–3607.
  13. Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Kempf I, Lastovica AJ, Lowery CJ, Matsuda M, Mcdowell DA, McMahan A, Millar BC, Rao JR, Rooney PJ, Seal BS, Snelling WJ and O Tolba. (2006).The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect*. 8: 1955–1966.
  14. Suzuki H, S Yamamoto.(2009). *Campylobacter* contamination in retail poultry

meats and by-products in the world: A literature survey. *J. Vet. Med. Sci.* 71 :255–261.

15. Tajada P, Gomez-Garces JL, Alos JI, Balas D and R Cogollos. (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 b-lactam agents and combinations with b-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*40: 1924–1925.
16. Van der Walt ML. (2004). *Campylobacter jejuni* infection. In Coetzer JAW, RC Tustin (Eds) *Infectious diseases of livestock* (II edn) Vol. 3. Oxford University Press, Cape Town, pp1479–1483.
17. Wang G, Clark CG., Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL and FG Rodgers. (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus subsp. fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4744–4747.
18. Wiczorek K, J Osek (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res Int.* 2013:1-12.

TABELLA 1. Profili di antibiotico resistenza di *C. coli* valutati mediante microdiluizione in brodo

		N° ceppi (%)					
	GM	S	CIP	TE	E	NA	C
R	1 (1,14)	0 (0)	88 (100)	88 (100)	* 3(3,4)	88 (100)	0 (0)
S	87 (98,86)	88(100)	0 (0)	0 (0)	* 85(96,6)	0 (0)	88 (100)

GM: gentamicina; S: streptomina; CIP: ciprofloxacina; TE: tetraciclina; E: eritromicina; NA: acido nalidixico; C: cloramfenicolo

\* differenza statisticamente significativa tra allevamenti

TABELLA 2. Profili di antibiotico resistenza di *C. jejuni* valutati mediante microdiluizione in brodo

		N° ceppi (%)					
	GM	S	CIP	TE	E	NA	C
R	0 (0)	*4 (18,1)	*18 (81,8)	5 (22,73)	0 (0)	*18 (81,8)	0 (0)
S	22 (100)	*18 (81,9)	*4 (18,2)	17(77,27)	22 (100)	*4 (18,2)	22 (100)

GM: gentamicina; S: streptomina; CIP: ciprofloxacina; TE: tetraciclina; E: eritromicina; NA: acido nalidixico; C: cloramfenicolo

\* differenza statisticamente significativa tra allevamenti



TABELLA 3. Profilo di antibiotico resistenza per *C. coli* nei confronti di beta -lattamici valutato tramite agar- diffusione in piastra

	N° ceppi (%)					
	AMP	CL	FOX	CTX	FEP	IPM
Resistenti	86 (97,6)*	88 (100)	88 (100)	85(96,5)*	0(0)	0(0)
Sensibili	2 (2,4)*	0 (0)	0 (0)	3(3,5)*	88(100)	88(100)

AMP: ampicillina; CL: cefalessina; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxime; FEP: cefepime; IPM: imipenem

\* differenza statisticamente significativa tra allevamenti

TABELLA 4. Profilo di antibiotico resistenza per *C. jejuni* nei confronti di beta lattamici valutato tramite agar diffusione in piastra

	N° ceppi (%)					
	AMP	CL	FOX	CTX	FEP	IPM
Resistenti	15(68,1)	22(100)	22 (100)	21(95,4)	0 (0)	0 (0)
Sensibili	7 (31,9)	0(0)	0 (0)	1 (4,6)	22(100)	22(100)

AMP: ampicillina; CL: cefalessina; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxime; FEP: cefepime; IPM: imipenem

TABELLA 5. Profili di multiresistenza (%)

CLASSI DI ANTIBIOTICI	N° (%)
CHIN,TET,MAC,PEN,CEF	3 (2,7)
CHIN,TET,PEN,CEF	94 (85,5)
AMIN, ,PEN, CEF	4 (3,63)
CHIN,TET,CEF	6 (5,45)

CHIN: chinoloni; TET:tetraciline; MAC: macrolidi; PEN: penicilline; CEF: cefalosporine

# VACCINAZIONE CON CEPPA TERMOSENSIBILE DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN UN GRUPPO DI POLLI RIPRODUTTORI PESANTI: DATI PRELIMINARI

Catania S.<sup>1</sup>, Moronato M. L.<sup>1,2</sup>, Fasoli P.<sup>3</sup>, Facchetti G.<sup>3</sup>, Rodio S.<sup>1</sup>, Gobbo F.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Laboratorio di Medicina Aviare. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD) Italy, e-mail: scatania@izsvenezie.it*

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

<sup>3</sup> *Gruppo Crescenti Passirano (BS)*

## Summary

*Mycoplasma synoviae* (MS) is considered an important poultry pathogen. Its pathogenic activities can cause economic losses in all the poultry production sectors and categories. Up to now the containment strategy is based on the maintenance of breeders' MS free status in order to avoid the spread of MS by vertical transmission. However many new outbreaks still occur either in meat or layer sectors, demonstrating the maintenance of this pathogen in our area.

Recently, a new thermosusceptible live vaccine has been introduced in the Italian market. In this study the behavior of this vaccine is investigated through the application of its specific plan to a broiler breeder group. Basing on our results, MS-H vaccinal strain has a high level of invasiveness inside the vaccinated group and it shows a high persistence during the time.

The contribution of several laboratory tests could be helpful in the discrimination of vaccinated groups from the infected one, even if the procedures are labor intensive and time consuming.

## INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma synoviae* (MS) è uno dei micoplasmi considerati patogeni per le specie avicole di interesse industriale, con importanti ripercussioni in termini produttivi. La trasmissione del patogeno può avvenire sia orizzontalmente (diffusione del patogeno tra animali/gruppi infetti) che verticalmente (trasmissione alla progenie attraverso l'uovo). Come per tutti i patogeni che hanno ripercussioni negative sulle *performances* zootecniche, diverse e svariate sono le misure che possono permettere un contenimento o mitigamento della problematica; tra queste possiamo ricordare la costituzione e il mantenimento dei gruppi di riproduttori MS-free, il trattamento antibiotico mirato in caso di infezione e recentemente anche la vaccinazione mediante un vaccino vivo allestito con un ceppo termosensibile.

La recente introduzione del vaccino ha naturalmente stimolato alcune domande sia dal punto di vista laboratoristico, che sul suo comportamento in campo. In particolare dal punto di vista diagnostico la differenziazione tra ceppi di campo "wild" e ceppi vaccinali rappresenta una sfida interessante, mentre conoscere un po' più in dettaglio i comportamenti del ceppo vaccinale in campo risulta essere molto utile per l'interpretazione dei dati analitici e quindi anche per la definizione dello stato

sanitario del gruppo.

Negli ultimi anni la possibilità di differenziare genotipicamente i ceppi di MS è stata applicata da differenti laboratori attraverso una metodica di PCR per il gene denominato *vlhA* (*Variable Lipoprotein Hemagglutinin A*), inoltre recentemente altri geni del patogeno sono stati indagati per meglio differenziare i ceppi vaccinali.

Scopo del presente lavoro è stato quello di monitorare un allevamento di riproduttori pesanti vaccinati con il ceppo termosensibile (MS-H) tramite indagine laboratoristiche sulla progenie ed eventualmente confermare che tale ceppo non è soggetto a trasmissione verticale.

A tal fine sono stati valutati diversi parametri come la sua stabilità genotipica e il mantenimento dello stesso all'interno dell'allevamento in funzione del tempo, e la risposta sierologica degli animali.

## **MATERIALI E METODI**

Un allevamento di riproduttori pesanti costituito da 6 capannoni in cui sarebbero stati accasati animali vaccinati è stato oggetto del seguente studio. I riproduttori appartenevano a due genetiche distinte ed in particolare Ross 308 e Cobb 500. Gli animali provenivano da un unico allevamento, fase pollastra in cui gli stessi erano suddivisi in 5 gruppi differenti.

Il campionamento in fase di pollastra (5 gruppi) ha previsto, pochi giorni prima della vaccinazione effettuata secondo le indicazioni del produttore, il prelievo di tamponi tracheali per l'esecuzione PCR MS (30 tamponi per capannone) e di campioni di sangue (30 per capannone) per l'esecuzione di ELISA e SAR per MS. Mentre il campionamento in fase di produzione prevedeva il prelievo di tamponi tracheali (10 per capannone) per PCR MS e di campioni di sangue (almeno 20 per capannone) per metodica ELISA e SAR, questi sono stati effettuati nelle settimane 25, 30, 38, 44, 49, 54, 60.

Inoltre, 30 uova scarto schiusa per capannone sono state processate mediante PCR per MS alle settimane 30, 40, 44, 49, 54, 60. Il sangue di pulcini di 1 giorno è stato valutato mediante metodica ELISA, le uova che avevano generato tali pulcini erano state deposte durante le settimane 41, 46 e 51.

A fine ciclo 10 carcasse per ogni gruppo sono state conferite al laboratorio di Medicina Aviaria dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per esame necroscopico e campionamento mirato per la diagnosi di MS.

Nello specifico tamponi tracheali, oviduttali o matrici biologiche presentanti lesioni riferibili ad infezione da *Mycoplasma synoviae* sono stati collezionati e destinati all'isolamento micoplasmi tramite metodica microbiologica e ricerca MS in PCR.

L'identificazione di specie degli isolati è avvenuta tramite metodica 16S-PCR-DG-GE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

I campioni risultati positivi per MS, sono stati ulteriormente testati con metodica biomolecolare per il gene *vlhA*, al fine di classificarli mediante il sequenziamento del suddetto gene.

## **RISULTATI**

I campioni effettuati alcuni giorni prima della vaccinazione hanno dato esito negati-

vo, mentre i campionamenti effettuati in fase di produzione hanno mostrato durante tutto il periodo di controllo una continua positività in PCR MS e parallelamente la sierologia ha mostrato positività sia in SAR che in ELISA.

In particolare la positività riscontrata in ELISA è stata sempre superiore al 70% dei campioni esaminati durante il periodo di controllo, solamente nel prelievo della 30<sup>a</sup> settimana abbiamo riscontrato una positività del 100% dei campioni esaminati.

Gli esami effettuati sulle uova scarto schiusa collezionate hanno sempre dato risultato negativo.

Infine sulle carcasse, a fine ciclo, abbiamo riscontrato positività in PCR da tutti i campioni tracheali analizzati, mentre i campioni oviduttali sono risultati negativi per MS. In isolamento è stata riscontrata positività a *Mycoplasma synoviae* da trachea in tutti i capannoni.

In un soggetto del capannone 2, dove è stata rilevata la presenza di bursite sternale, abbiamo dimostrato mediante PCR la presenza di MS in questa sede.

Il sequenziamento del gene *vlhA* ha rilevato omologia con il ceppo MS-H in tutti i campioni analizzati ad eccezione di 2 campioni dove è stata riscontrata una sequenza nucleotidica che differisce per una delezione (39 nucleotidi) nel tratto PRR del gene.

## **Conclusioni**

Il presente studio ha permesso di meglio capire il comportamento del ceppo vaccinale in un allevamento di polli riproduttori pesanti. In particolare abbiamo notato un elevato potere di diffusione del ceppo termosensibile, confermato dalla continua positività in PCR durante tutto il periodo produttivo. Inoltre il ceppo vaccinale in questione presenta anche un'elevata capacità di persistenza dimostrata dalla possibilità di isolamento dello stesso in animali a fine ciclo. Il ceppo vaccinale non sembra tuttavia avere capacità di diffusione a carico del distretto oviduttale, dato confermato anche dalla negatività rilevata nei campioni di uova scarto schiusa durante tutto il periodo di monitoraggio. Dal punto di vista sierologico si è potuta riscontrare una sieroconversione in almeno il 70% dei soggetti, inoltre dalle prove ELISA effettuate nella progenie ad 1 giorno di vita gli anticorpi anti-MS risultano rilevabili.

Le analisi biomolecolari per la genotipizzazione dei ceppi isolati hanno evidenziato e permesso di classificarli come genotipo C3, che risulta essere lo stesso genotipo del ceppo vaccinale utilizzato, ad eccezione di 2 campioni in cui abbiamo riscontrato una sequenza differente, evidenziando un possibile riarrangiamento del segmento genico studiato.

In conclusione, sebbene siano dati preliminari si nota come tale ceppo vaccinale mostri un'ampia diffusione e mantenimento nel gruppo e induca una evidente sieroconversione dei soggetti. La trasmissione mediante uova non è stata dimostrata ed infine abbiamo riscontrato 2 campioni con genotipo *vlhA* differente da quello caratterizzante il ceppo vaccinale.

Anche se non particolarmente semplice dal punto di vista laboratoristico, potrebbe essere possibile nella maggior parte dei casi insistenti nel nostro territorio differenziare gruppi vaccinati da gruppi infetti con MS di campo.

# STUDIO SPERIMENTALE PRELIMINARE DELL'EFFETTO DELL'AD- DIZIONE ALL'ACQUA DI BEVANDA DI *LACTOBACILLUS ACIDOPHI- LUS* D2/CSL SULLE PERFORMANCE PRODUTTIVE E SULLA MICRO- FLORA INTESTINALE DEL POLLO DA CARNE

Cesari V.<sup>1</sup>, Giardini A.<sup>3</sup>, Gallazzi D.<sup>2</sup>, Toschi I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Milano;*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano;*

<sup>3</sup> *Centro Sperimentale del Latte S.r.l.*

## Summary

In poultry production, the administration of probiotics via either the drinking water or feed have beneficial effects on broiler performance and intestinal microbial characteristics. The aim of this study was to evaluate the effect of addition of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL to drinking water on broiler performance and microbial population. Two consecutive trials were conducted on twenty thousand 1-day-old Ross broiler which were housed in pens in an environmentally controlled poultry house. The animals, from 0 to 42 days of age, were divided into two groups: the animals of the Treatment group (T) received water with the supplementation of *L. acidophilus* D2/CSL, while the broiler of the Control (C) group received water without any addition. The dosages were:  $3.0 \cdot 10^8$  CFU/animal/day for the first 4 days,  $2.0 \cdot 10^8$  CFU/animal/day from 5<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> day and  $1.0 \cdot 10^8$  CFU/animal/day from 20<sup>th</sup> to 42<sup>nd</sup> day.

During the whole experimental period, feed consumption and body weights of 150 randomly selected animals per group were registered every week. Ten birds from each group were weekly killed by cervical dislocation and microbiological analysis was performed on crop and small intestine.

During the experimental period and in both trials, body weight of broilers was significantly affected by the supplementation of lactobacilli. In particular, broilers receiving water supplemented with *L. acidophilus* D2/CSL showed body weights significantly higher than those having drunk water without the additive (2333 vs. 2189 g for Trial 1, 2477 vs. 2432 g for trial 2, respectively for T group and C group). Feed conversion rate of the animals and mortality, instead, were not significantly affected by the supplementation of lactobacilli. Moreover, the microbial counts of the gastrointestinal tract showed a mild increase in lactobacilli versus a weak decrease in enterobacteria and clostridia, although no significant differences were observed between the T and C groups. In conclusion, body weight of broilers was affected by the addition of *L. acidophilus* D2/CSL, even if other parameters were not influenced.

## INTRODUZIONE

I probiotici sono microrganismi vivi che, somministrati in quantità adeguate, conferiscono benefici di varia natura alla salute dell'ospite.

*Lactobacillus acidophilus*, in particolare, è una delle principali specie che alberga nell'intestino dell'uomo e degli animali domestici e presenta una elevata capacità di aderire alle cellule epiteliali del digerente del pollo. Numerosi studi hanno evidenziato effetti positivi della somministrazione di lattobacilli sulle performance del pollo da carne e questi sono stati spesso correlati al riequilibrio del microbiota gastrointestinale, ovvero all'incremento delle popolazioni microbiche commensali e saccarolitiche a discapito di quelle potenzialmente patogene e putrefattive.

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare l'effetto dell'aggiunta all'acqua di bevanda di *L. acidophilus* D2/CSL sulle performance produttive e su alcune popolazioni microbiche del digerente del pollo da carne.

## **MATERIALI E METODI**

La prova è stata effettuata, in due ripetizioni consecutive della durata di 42 giorni, su ventimila broiler ROSS, vaccinati per Newcastle, bronchite infettiva e malattia di Marek.

Gli animali, provenienti da un incubatoio commerciale, sono stati pesati e successivamente suddivisi in due gruppi sperimentali: Controllo e Trattato. I broiler del gruppo T ricevevano acqua addizionata con *L. acidophilus* D2/CSL, mentre agli animali del gruppo C era stata somministrata acqua senza alcuna addizione. I dosaggi erano:  $3,0 \cdot 10^8$  UFC/animale/giorno per i primi 4 giorni di età,  $2,0 \cdot 10^8$  UFC/animale/giorno dal 5° al 19° giorno e  $1,0 \cdot 10^8$  UFC/animale/giorno dal 20° giorno a fine ciclo. I broiler sono stati allevati in recinti utilizzando truciolo di legno come lettiera.

Durante il periodo sperimentale, tutti gli animali sono stati alimentati *ad libitum* con tre diverse diete commerciali (dieta starter fino a 14 giorni, dieta di accrescimento dal 15° al 28° giorno di vita e dieta di ingrasso dal 29° al 42° giorno di età). L'antibiotico salinomycin (70 ppm) è stata addizionata a tutte le diete.

Durante tutto il periodo sperimentale, le performance di crescita, quali il peso vivo e l'Indice di Conversione Alimentare (ICA), sono state determinate una volta a settimana su 150 animali per gruppo. La mortalità è stata rilevata quotidianamente e tutti gli animali deceduti durante il periodo sperimentale sono stati sottoposti a necropsia. Ogni settimana, inoltre, 10 animali per gruppo sono stati soppressi e il contenuto del gozzo e dell'intestino tenue è stato prelevato in condizioni asettiche per le successive analisi microbiologiche. Tutti i dati raccolti durante la prova sono stati sottoposti ad analisi della varianza ANOVA (SAS 9.1, 2001).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

I risultati dell'effetto dell'aggiunta di *L. acidophilus* D2/CSL all'acqua di bevanda sulle performance di crescita delle due prove sono mostrati in Tabella 1. Nella prima prova, a partire dalla quinta settimana di somministrazione del probiotico, il peso degli animali trattati è risultato statisticamente più elevato rispetto a quello dei broiler del gruppo C. Il medesimo risultato è stato osservato anche nella seconda prova nella quale, tuttavia, le differenze significative tra i

due gruppi sperimentali si sono palesate già a partire dalla quarta settimana di allevamento (1181 vs. 1135 g, rispettivamente per il gruppo T e C).

Il differente peso vivo finale riscontrato nelle due prove effettuate, con valori più elevati nel trial 2 sia nel gruppo T che nel gruppo C, è probabilmente da ricondurre al diverso periodo dell'anno in cui sono state effettuate le due prove: in inverno la prima, con temperature più rigide, e in primavera con condizioni ambientali più miti, la seconda.

L'aggiunta di *L. acidophilus* D2/CSL, invece, non ha influenzato in modo significativo l'ICA in entrambe le prove. Nessuna differenza è stata riscontrata anche nella mortalità degli animali che, anche in questo caso, è risultata complessivamente maggiore nel corso della prima prova.

Tabella 1: Effetto dell'aggiunta all'acqua di bevanda di *L. acidophilus* D2/CSL sulle performance produttive del pollo da carne (A,B: P<0,01; a,b: P<0,05)

	Sett 1		Sett 2		Sett 3		Sett 4		Sett 5		Sett 6	
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
<b>PROVA 1</b>												
<i>Peso vivo (g)</i>	122	119	318	318	789	772	1162	1185	1865 <sup>A</sup>	1794 <sup>B</sup>	2333 <sup>A</sup>	2189 <sup>B</sup>
<i>ICA</i>	1,25	1,40	1,33	1,34	1,30	1,31	1,44	1,41	1,48	1,54	1,60	1,68
<i>Mortalità (%)</i>	1,77	1,81	2,28	2,46	2,93	3,09	3,21	3,39	3,55	3,70	4,12	4,32
<b>PROVA 2</b>												
<i>Peso vivo (g)</i>	128	140	290	317	655	687	1181 <sup>a</sup>	1135 <sup>b</sup>	1760 <sup>a</sup>	1705 <sup>b</sup>	2477 <sup>a</sup>	2432 <sup>b</sup>
<i>ICA</i>	1,25	1,38	1,21	1,14	1,22	1,20	1,30	1,39	1,41	1,48	1,51	1,55
<i>Mortalità (%)</i>	0,58	0,80	1,16	1,20	1,73	1,75	2,04	2,16	2,46	2,71	3,35	4,40

La Tabella 2 riporta i risultati delle analisi microbiologiche effettuate sul contenuto del gozzo e dell'intestino tenue. In entrambe le prove, il contenuto di lattobacilli del gozzo e dell'intestino tenue è risultato maggiore, anche se non significativamente, nel gruppo Trattato rispetto a quello Controllo; le conte degli enterobatteri e dei clostridi, invece, sono risultate numericamente più basse nel gruppo di animali che ricevevano i lattobacilli.



Tabella 2: Effetto dell'aggiunta all'acqua di bevanda di *L. acidophilus* D2/CSL sulle caratteristiche microbiologiche del gozzo e dell'intestino tenue (log<sub>10</sub> UFC/g di contenuto)

	Sett 1		Sett 2		Sett 3		Sett 4		Sett 5		Sett 6	
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
<i>PROVA 1</i>												
<b>Gozzo</b>												
<i>Enterobatteri</i>	6,5	6,3	5,8	6,6	6,2	6,5	5,2	5,5	6,3	6,8	5,5	5,3
<i>Lattobacilli</i>	8,7	8,7	9,0	8,8	8,9	8,6	9,5	9,2	8,9	8,6	9,2	8,8
<i>Clostridi</i>	8,0	7,9	6,8	7,3	7,9	8,2	8,8	8,8	8,4	8,6	8,7	8,6
<b>Intestino tenue</b>												
<i>Enterobatteri</i>	7,8	8,0	6,9	7,2	7,4	7,6	5,4	5,6	6,2	5,9	4,4	5,9
<i>Lattobacilli</i>	8,4	8,4	8,3	7,9	8,6	8,1	9,0	8,6	7,8	7,9	8,3	8,2
<i>Clostridi</i>	7,4	7,6	6,9	7,3	7,7	7,8	8,1	8,4	7,3	7,6	7,9	8,1
<i>PROVA 2</i>												
<b>Gozzo</b>												
<i>Enterobatteri</i>	6,6	6,0	7,2	6,8	7,6	7,3	5,9	6,6	5,8	5,6	7,3	7,2
<i>Lattobacilli</i>	9,1	9,0	9,6	9,2	9,0	9,0	9,1	8,8	9,0	9,2	9,3	9,1
<i>Clostridi</i>	8,2	8,6	8,4	8,2	8,7	8,7	9,0	8,8	8,9	9,0	9,1	9,2
<b>Intestino tenue</b>												
<i>Enterobatteri</i>	7,7	7,2	5,6	6,6	7,0	7,7	5,5	6,5	6,0	6,2	6,2	6,5
<i>Lattobacilli</i>	8,0	8,2	7,9	8,2	8,0	8,4	7,8	7,8	7,6	7,7	8,2	8,0
<i>Clostridi</i>	8,1	8,1	6,5	6,8	7,7	8,2	7,3	7,7	8,0	8,0	8,2	8,9

## CONCLUSIONI

In entrambe le prove, il peso degli animali che ricevevano acqua addizionata con *L. acidophilus* D2/CSL è risultato statisticamente superiore rispetto a quello dei broiler del gruppo controllo. L'aggiunta all'acqua di bevanda dei lattobacilli, invece, non ha influenzato in modo significativo l'ICA e la mortalità degli animali. Anche i risultati delle analisi microbiologiche del contenuto del gozzo e dell'intestino tenue, limitate a soli tre gruppi microbici, non hanno mostrato differenze statisticamente significative.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. FILD/IDF Standard n° 117A/1988, Yogurt-enumeration of characteristic microorganisms – colony count technique at 37°C.
2. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
3. Jin L.Z., Ho Y.W., Ali A.M., Abdullah N., Ong B.K., Jalaludin S. 1996. Adhesion of *Lactobacillus* isolates to intestinal epithelial cells of chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:229-232.
4. Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah N., Jalaludin S. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* 77:1259-1265.
5. Kalavathy R., Abdullah N., Jalaludin S., Ho Y.W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *Br. Poul. Sci.* 44:139-144.
6. SAS 9,1, 2001, SAS Inst, Inc., Cary, NC.

## TRASMISSIONE VERTICALE: UNA POSSIBILE VIA DI INFEZIONE PER I CIRCOVIRUS?

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

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

### Summary

In this study, the possibility of the vertical transmission of *Circovirus* was investigated in a flock of infected Gouldian finches. The detected virus was previously classified as a *BFDV* strain by sequence analysis. Eggs were collected in the flock for three subsequent reproductive seasons. The DNA virus was found in the eggs only in the first reproductive season. 24,39 % of the tested eggs resulted positive. *Circovirus* DNA was detected in yolk while all samples of glair tested negative. The findings strongly suggest that the vertical transmission of *circovirus* is possible. Nevertheless, it seems to occur only in the first year of the outbreak.

### INTRODUZIONE

La famiglia *Circoviridae* comprende attualmente due generi, *Gyrovirus* e *Circovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses). I virus appartenenti al genere *Circovirus* sono di ridotte dimensioni, non presentano *envelope* e possiedono un genoma circolare a DNA a doppio filamento delle dimensioni approssivamente di 2 kb (Niagro et al., 1998, Todd et al. 2004; Varsani et al., 2010).

Tra i mammiferi, le infezioni da *Circovirus* sono state associate a manifestazioni cliniche nel suino (Allan and Ellis, 2000; Ellis et al. 1999), nei cani (Li et al. 2013; De Caro et al. 2014) e, recentemente, in visoni affetti da patologia enterica (Lian et al. 2014). Tra i volatili, il circovirus più noto è il responsabile della malattia del becco e delle penne (*Beak and Feather Disease Virus - BFDV*) dei pappagalli, caratterizzata da immunodepressione e da tipiche alterazioni del becco e del piumaggio (Todd, 2000).

*Circovirus* è stato identificato in numerose altre specie di volatili non psittaciformi, tra cui i piccioni (Duchatel et al., 2006; Todd et al. 2008), lo struzzo (Shivaprasad et al. 1993; Eisenberg et al. 2003), l'oca (Chen et al. 2003; Yu et al. 2007), il cigno (Halami et al. 2008), l'anatra (Smyth et al., 2005; Zhang et al. 2013), il gabbiano (Twentyman et al, 1999), il corvo australiano (Stewart et al, 2006), lo storno (Dayaram et al, 2013), il canarino (Todd et al., 2001; Phenix et al., 2001; Rampin et al., 2006), ed il diamante di Gould (Shivaprasad et al., 2004). Le manifestazioni cliniche e le lesioni indotte dal virus non sono tuttavia costanti e sovrapponibili nelle diverse specie. D'altro canto anche nei pappagalli, in cui *circovirus* è di solito associato alla Malattia del becco e delle penne, l'infezione può evolvere a volte senza sintomi specifici evidenti (Circella et al. 2012; Todd et Gortazar, 2012). Le diverse evoluzioni dell'infezione così come la gravità sembrano poter essere influenzate da numerosi fattori tra cui la specie colpita, l'età degli animali, il livello di anticorpi materni, i diversi stipiti virali coinvolti nell'infezione, la dose infettante e la co-

presenza di altri agenti patogeni (de Kloet et de Kloet, 2004).

Analogamente, anche alcuni aspetti epidemiologici dell'infezione non sono del tutto chiari. E' noto che l'infezione si trasmetta per via orizzontale attraverso l'assunzione, sia in maniera diretta che indiretta, del virus diffuso dagli animali infetti con le desquamazioni cutanee, le penne, le feci e il rigurgito, il quale può favorire infezioni molto precoci dei soggetti recettivi, già in fase di nidiacei (Gerlach, 1994; Todd 2004).

Tuttavia, l'evenienza di una trasmissione verticale dell'infezione è stata ipotizzata già diversi anni fa, in seguito a prove sperimentali che hanno portato ad evidenziare l'insorgenza dell'infezione in nidiacei di pappagallo nati in incubatrice, e pertanto senza aver avuto un contatto diretto con i riproduttori positivi al virus (Gerlach, 1994). Gli studi in proposito ad oggi sono ancora scarsi e frammentari.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare la trasmissione verticale del virus in un gruppo di volatili in corso di infezione naturale da *circovirus*.

## **MATERIALI E METODI**

### *Allevamento oggetto dello studio*

Lo studio è stato condotto in un gruppo di Diamanti di Gould, in cui era stata diagnostica un'infezione da *circovirus* le cui caratteristiche genetiche consentivano di classificarlo come ceppo *BFDV* (Circella et al. 2014). Il gruppo di volatili era costituito da cinque coppie di riproduttori di età compresa tra i 2 e i 3 anni, al momento dell'insorgenza dell'infezione. Nei riproduttori erano state osservate alterazioni evidenziabili già macroscopicamente, quali allungamenti e insorgenza di rugosità e deformità, a carico del becco, sovrapponibili alle lesioni osservabili in corso di PBF (Psittacine Beak and Feather Disease) nel pappagallo. L'indagine per verificare la possibilità di una trasmissione verticale dell'infezione è stata condotta per tre differenti stagioni riproduttive. Nel corso di ciascun periodo, le uova da esaminare sono state raccolte direttamente dai singoli nidi entro pochi giorni dalla deposizione. Sono state successivamente trasportate in condizioni di refrigerazione presso la sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Bari per le indagini.

In totale, sono state raccolte 119 uova, provenienti dai differenti nidi, come riportato nella tabella 1. Ciascun uovo è stato sottoposto alla disinfezione del guscio con alcool etilico. Asetticamente, si è provveduto a raccogliere separatamente i campioni di tuorlo e albume. Solo in tre casi, è stata evidenziata la presenza di un embrione di pochi millimetri.

### *Estrazione del DNA, PCR, clonaggio e sequenziamento*

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando kit Eurogold Tissue Mini Kit (EuroClone, Milano, Italia) secondo le indicazioni della casa produttrice. La ricerca del virus è stata condotta in PCR, utilizzando primers DCiVf/DCiVr (Todd et al., 2001), che amplificano una regione del gene *rep*. Tre ampliconi generati da tre differenti uova sono stati clonati, sequenziati, assemblati ed allineati. Essendo identici tra loro, solo uno è stato allineato con il segmento corrispondente del gene *rep* del *circovirus* identificato nei riproduttori, in GenBank con numero di accesso

JX131620, e con un pannello rappresentativo di *circovirus*: *Porcine Circovirus* (PCV1 - U49186; PCV2 - AF055392), *Canary Circovirus* (CaCV - AJ301633), *Columbid Circovirus* (CoCV - AF252610), *Finch Circovirus* (FiCV - DQ845075) e BFDV (AF311299 Tha; FJ685979 Csu; EF457975 Nho; AY521238 Per; AY521235 Aro).

## RISULTATI

L'analisi delle sequenze ottenute ha evidenziato la piena identità a livello nucleotidico tra il virus identificato nelle uova e lo stipite BFDV proveniente dai riproduttori. *Circovirus* è stato identificato nelle uova solo durante la stagione riproduttiva corrispondente all'anno in cui si è verificata l'infezione, e quindi durante il primo periodo considerato (tabella 1).

Nei due anni successivi, nonostante la positività dei riproduttori al virus a livello delle penne, *circovirus* non è stato riscontrato nelle uova. Nella prima stagione riproduttiva (2011), la percentuale di positività delle uova è risultata in totale pari a 24.39 % (10/41) (tabella 3). Le uova positive venivano riscontrate nei nidi n. 1, 2 e 3. Le uova prelevate dal nido 4 e dal nido 5 sono risultate sempre negative.

In tutti i casi di positività, il virus veniva evidenziato nel tuorlo, mentre i campioni di albume sono risultati costantemente negativi.

Tabella 1. Uova esaminate e riscontro nei tuorli di positività in PCR per *Circovirus*

Periodo	Nido 1		Nido 2		Nido 3		Nido 4		Nido 5		Totale	
	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%
2011	4 (9)	44.4	2 (8)	25	4 (8)	50	0 (9)	0	0 (7)	0	10 (41)	24.39
2012	0 (15)	0	0 (6)	0	0 (10)	0	0 (14)	0	0 (8)	0	0 (53)	0
2013	0 (6)	0	0 (2)	0	0 (6)	0	0 (5)	0	0 (6)	0	0 (25)	0
Totale	4 (30)	13,3	2 (16)	12,5	4 (24)	16,6	0 (28)	0	0 (21)	0	10 (119)	8,4

Pos = numero uova positive    N° = numero uova esaminate    % = percentuale di positività

## DISCUSSIONE

Il riscontro di *circovirus* nelle uova sembra evidenziare una trasmissione del virus anche per via verticale nel gruppo colpito dall'infezione. Non è da escludere tuttavia che la positività delle uova possa esser dovuta ad una penetrazione del virus all'interno dell'uovo attraverso i pori del guscio, analogamente a quanto si verifica in caso di altri patogeni, spesso di origine batterica. In questo caso, tuttavia, ci si aspetterebbe la positività in PCR anche dei campioni di albume che, per le caratteristiche strutturali dell'uovo, verrebbe in contatto con il virus per primo rispetto al tuorlo. Inoltre, è possibile che nell'albume il virus possa giungere

anche in seguito a contaminazione, per via ascendente dalla cloaca, dell'ovidutto e successivamente dell'albume durante la sua formazione in questo distretto. Precedenti ricerche effettuate nella cocorita (*Melopsittacus undulatus*) (Rahaus et al., 2008) hanno evidenziato la presenza del virus in 6 di 17 (35,3 %) campioni di albume esaminati, mentre i corrispondenti campioni di tuorlo sono risultati costantemente negativi. Analogamente, in ricerche condotte nell'anatra (Li et al., 2014) sulle modalità di trasmissione di DuCV1 e DuCV2, i virus venivano evidenziati, in caso di uova non embrionate, esclusivamente nell'albume, anche se in bassa percentuale (3,75%). In entrambe le ricerche, *circovirus* veniva rilevato in PCR nelle uova embrionate, in percentuali variabili dal 6,67 % (Li et al., 2014) al 20 % (Rahaus et al., 2008). Gli Autori sostenevano pertanto che per supportare questa modalità di trasmissione fosse determinante la presenza dell'embrione.

Nella presente ricerca, in tutti i casi in cui è stata rilevata la positività delle uova, questa era dovuta alla positività del tuorlo, mentre i corrispondenti campioni di albume sono sempre risultati negativi. Per quanto sia possibile che il virus sia passato in entrambi i distretti ma nell'albume, più ricco di difese antimicrobiche naturali rispetto al tuorlo, in quantità più basse tanto da non risultare rilevabile in PCR, la negatività degli albumi osservata potrebbe indurre ad escludere una contaminazione attraverso il guscio e a considerare che molto più probabilmente si sia trattato di una vera e propria trasmissione verticale con un effettivo passaggio, nella femmina, del virus a livello del follicolo e quindi del tuorlo dell'uovo.

In ogni caso, tale modalità di trasmissione non sembrerebbe aver rivestito, nel gruppo, particolare rilievo dal punto di vista epidemiologico, in quanto si sarebbe verificata solo nel primo anno considerato, cioè durante l'esordio del focolaio. Nelle due stagioni successive, nonostante la positività in PCR a livello del follicolo delle penne dei riproduttori con la possibilità di eliminare il virus nell'ambiente attraverso penne e desquamazioni cutanee, il virus non è stato più rilevato nelle uova. Inoltre, anche nel corso della prima stagione, non tutte le coppie davano origine a uova infette, anche se la percentuale di uova positive, soprattutto nei nidi 1 e 2, risultava rilevante rispetto a quanto precedentemente riscontrato da altri Autori.

Un dato molto interessante che emerge dalla ricerca è quello molecolare che conferma l'effettiva corrispondenza del virus identificato nelle uova con quello dei riproduttori, in quanto sembrerebbe evidenziare un notevole adattamento di specie dello stipite *BFDV*, che oltre ad aver riprodotto nell'adulto le manifestazioni cliniche sovrapponibili a quelle generalmente osservate nel pappagallo in corso di Malattia del Becco e delle Penne, sembrerebbe aver avuto una buona capacità di diffusione nell'organismo con coinvolgimento dell'apparato riproduttore.

## CONCLUSIONI

I dati ottenuti sembrano evidenziare il verificarsi di trasmissione verticale di *circovirus* in corso di infezione, anche in caso di stipiti che infettano una specie che non rappresenta quella di elezione. Tuttavia, l'eliminazione del virus attraverso le uova, per quanto possa anche avvenire in percentuali non trascurabili, sembra limitata nel tempo e non sembra perdurare per più di una stagione riproduttiva.

## BIBLIOGRAFIA

- Allan G.M., Ellis J.A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3-14.
- Chen, C.L., Chang P.C., Lee M.S., Shein J.H., Ou S.J., Shieh H.K. (2003). Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. *Avian Pathology*, 32, 165-171.
- 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.
- Circella E., Legretto M., Pugliese N., Caroli A., Bozzo G., Accogli G., Lavazza A., Camarda A. (2014). Psittacine beak and feather disease-like illness in Gouldian finches (*Chloebia gouldiae*). *Avian Diseases* 58(3): 482-487.
- 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 Caro N., Martella V., Desario C., Lanave G., Circella E., Cavalli A., Elia G., Camero M., Buonavoglia C. (2014). Genomic characterization of a Circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. *PloS ONE*, 9 (8), 1-5.
- 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.
- Duchatel, J. P., Todd D., Smyth J. A., Bustin J.C., Vindevogel. H. (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., van Asten A.J.A.M., van Ederen A.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.
- Ellis J.A., Krakowka S., Laimore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy S., McNeilly F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 3-14.
- 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.



- Li L., McGraw S., Zhu K., Leutenegger C.M., Marks S.L., Kubiski S., Gaffney P., Dela Cruz F.N.Jr, Wang C., Delwart E., Pesavento P.A. (2013). Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg. Infect Dis.* 19(4), 534-541.
- Li Z., Wang X., Zhang R., Chen J., Xia L., Lin S., Xie Z., Jiang S. (2014). Evidence of possible vertical transmission of duck circovirus. *Veterinary Microbiology*,174: 229-232.
- Lian H., Liu Y., Li N., Wang Y., Zhang S., Hu R. (2014). Novel circovirus from mink, China. *Emerg. Infect Dis.* 20(9), 1548-1550.
- Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Archives of Virology.* 143, 1723-1744.
- Phenix, K.V., Weston J.H., Ypelaar I., Lavazza A., Smyth J.A., Todd D., Wilcox G.E., Radial S.R. (2001). Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *Journal of General Virology*, 82, 2805-2809.
- Rahaus M., Desloges N., Probst S., Loebbert B., Lantermann W., Wolff M.H. (2008). Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacines birds. *Veterinari Medicina*, 53: 53-58.
- 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., 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.
- 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.H., Soike D., Smyth J.A. (2001 b). Genome sequence determination and analyses of novel circovirus from goose and pigeons. *Virology*, 286: 354-362.

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

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, J.A. Smyth. (2008). Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Research in Veterinary Science*, 84, 311- 319.

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.

Yu X., Zhu C., Zheng X., He S., Liu X. (2007). Genome analysis and epidemiological investigation of goose circovirus detected in eastern China. *Virus Genes*. 35(3), 605-609.

Zhang Z., Jia R., Lu Y., Wang M., Zhu D., Chen S., Yin Z., Chen X., Cheng A. (2013). Identification, genotyping, and molecular evolution analysis of duck circovirus. *Gene* 529(2), 288-295.

## THE TURKEY INTESTINAL MICROBIOME: A NEXT GENERATION SEQUENCING APPROACH

D'Andrea S.<sup>1,2</sup>, Sánchez Bonastre A.<sup>2</sup>, Cuscó Martí A.<sup>2</sup>, Cecilian F.<sup>1</sup>, Francino O.<sup>2</sup>, Grilli G.<sup>1</sup>, Saita M.<sup>1</sup>, Lecchi C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Animali e Salute Pubblica, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy*

<sup>2</sup> *Department of Animal and Food Science, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain*

### Summary

The diversity and functions of microbes in the gastrointestinal tract is a field of ongoing research, aiming to establish the correlation between them and different genetic changes, diseases, relationship with therapy and the influence on metabolism or immune system of the host (Moura-Alvarez et al. 2014, Danzeisen et al. 2013). The distribution of bacterial population depends on the environment, the different zones of the organism in which microbes grow, the age and the diet of the host.

For our study, samples from four parts of the intestine of turkeys (duodenum, jejunum, ileum and cecum) were collected to obtain a characterisation of intestinal microbiome. Four abundant phyla were found: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria. For these phyla analysis at family level were performed, and results shown that Lactobacillaceae family has the higher percentage in samples, while at genus level *Lactobacillus* (phylum Firmicutes), is the most abundant and homogeneously distributed bacterial genus presented in the gut of turkeys, except in cecum zone.

### INTRODUCTION

The word “microbiome” defines at genetic level the presence of different microorganisms in the host, without distinguish among beneficial, neutral or damaging. Considering bacteria species, they are distributed with different density in the organism of the host, depending on the area in which they are located. The chemical and physiological conditions of each part of the organism can determine the growth of bacterial populations.

The gastrointestinal microflora is composed by fungi, protozoa and bacteria, the last one being the predominant microorganisms. Each tract develops different populations of bacteria, that continue to change during growth of birds as correlated to age, diet, breed, and geographic location (Danzeisen et al. 2013, Choi et al. 2014, Scupham et al. 2008). Intestine bacterial populations contribute to the production of vitamins and stimulate the immune system in avian species, but also can cause localized or systemic infections. Independently from health status and life condition (domestic or wild animals), avian microbiome is composed at phylum level by Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria, while *Lactobacillus* and *Enterococcus* (belonging to Firmicutes phylum) are the most abundant genera (Oakley et al. 2014).

The aim of this study was to inspect the bacterial distribution, analysing four tracts of the intestine of turkeys: duodenum, jejunum, ileum and cecum.

## **MATERIALS AND METHODS**

Samples were collected from both mucosa and content of the intestine of turkeys:

- 4 samples from duodenum tract
- 8 samples from jejunum tract
- 4 samples from ileum tract
- 4 samples from cecum tract

Bacterial DNA was extracted and then quantified by nanodrop.

To obtain informations about bacterial populations, the hypervariable regions V1-V2 of 16S rRNA gene were amplified by PCR, and then Ion torrent - Next Generation Sequencing (Life Tecnology) analysis were performed. With this tecnology we are able to have a lot of information from samples in few time as compared to other techniques.

## **RESULTS**

The sequences of intestinal turkey microbiome were analysed at phylum, family, genus and species level. Distribution of bacteria in duodenum, jejunum and ileum part is homogeneous at various taxonomic levels, while the composition of cecum one is different.

### **Phylum level.**

The most abundant phyla found are: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria.

Our data show that Firmicutes is the most abundant phylum (range percentage: 45% - 99%) in three intestinal tracts of duodenum, jejunum and ileum, except in the cecum (range percentage: 29% - 52%).

Bacteroidetes phylum (range percentage: 37% - 57%) and Proteobacteria phylum (percentage range: 7% - 12%) are homogeneous and abundant only in cecum zone. Actinobacteria is presents in only few samples, with a percentage up to 22%.

**Family level.** The most abundant family is Lactobacillaceae (phylum Firmicutes), presents in three intestinal tracts (range from 32% to 99%), except in cecum one (range from 1% to 2,28%).

In ileum zone, samples belong mainly to two families: Lactobacillaceae and Pepto-streptococcaceae (both belong to Firmicutes phylum).

In cecum zone, the distribution of bacteria is completely different from the other samples. The most abundant families detected are: Bacteroidaceae (range from 7% to 30%), Order Bacteroidales (range from 10% to 30%) and Lachnospiraceae (range from 12% to 29%).

**Genus and species level.** The major part of sequences found were classified up to family level. The few ones that can be classified at genus level belong to *Lactobacillus*. In this genus the most abundant species is *L. crispatus*: in duodenum, jejunum and ileum zone the range is from 1% to 87%, and in cecum zone is from 0.08% to 0.27%.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

This is the first study in which intestinale microbiome in turkeys is characterised. Using Ion Torrent – Next Generation Sequencing, we have obtained information about different bacterial populations that live in the intestine of turkeys in four zones of it.

Predominant bacteria phyla found in our samples were: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria. In particular the percentage of Firmicutes is higher respect the other phyla, and is almost homogeneous in duodenum, jejunum and ileum zone, but not in cecum one. The most abundant family found in our samples is Lactobacillaceae, belonging to phylum Firmicutes, and of this family the most abundant genus is *Lactobacillus*.

The cecum zone shows a different distribution of bacteria, at phylum level we obtained a high percentage of Bacteroidetes and Firmicutes, while Proteobacteria is homogeneously ditributed but with a lower percentage respect the other phyla. At family level Bacteroidaceae, belonging to Bacteroidetes phylum, was the most abundant family found togheter with Lachnospiraceae and Veillonellaceae families, both belonging to Firmicutes phylum.

Our data were in agreement with the ones of previous studies:

- Firmicutes is the most abundant phylum in the intestine except for cecum zone.
- Cecum zone has a different bacterial distribution, respect the other intastinal zones.
- Lactobacillaceae is the most abundant bacterial family in the intestine of avian species.
- *Lactobacillus* is the most abundant genus found in chickens and turkeys.

*Lactobacillus* genus was analysed at species level. In all the intestinal areas, except the cecum, *Lactobacillus crispatus* was the most abundant species found, with a percentage until 85%.

Previous studies describe the genus *Lactobacillus* like the most abundant in the upper part of the intestine of animals, togheter with *Enterococcus* and *Bifidobacterium* (Oakley et al. 2014, Wei et al. 2013). They also report the most abundant species in the intestine belonging to *Lactobacillus* genus: *L. johnsonii* and *L. reuteri*. Those results are not in agreement whit what reported in the present finding because we did not found high percentages of *Enterococcus* and *Bifidobacterium* . On the contrary, the most abundant species found was *L. crispatus*.

## REFERENCES

1. Danzeisen JL, Calvert AJ, Noll SL, McComb B, Sherwood JS, Logue CM, Johnson TJ. Succession of the turkey gastrointestinal bacterial microbiome related to weight gain. PeerJ. 2013 Dec23;1:e237. doi: 10.7717/peerj.237. eCollection 2013.

2. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ, Cox NA. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett.* 2014 Nov;360(2):100-12. doi: 10.1111/1574-6968.12608. Epub 2014 Oct 13.
3. Moura-Alvarez J, Nuñez LF, Astolfi-Ferreira CS, Knöbl T, Chacón JL, Moreno AM, Jones RC, Ferreira AJ. Detection of enteric pathogens in Turkey flocks affected with severe enteritis, in Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2014 Aug;46(6):1051-8. doi: 10.1007/s11250-014-0612-7. Epub 2014 May 12.
4. Scupham AJ, Patton TG, Bent E, Bayles DO. Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. *Microb Ecol.* 2008 Aug;56(2):322-31. doi: 10.1007/s00248-007-9349-4. Epub 2008 Jan 8.
5. Choi J.H., Kim G.B., and Cha C.J.: Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of boiler chickens. *Poultry Science* 93 :1942–1950, 2014.
6. Wei S., Morrison M., and Yu Z.: Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poultry Science* 92 :671–683, 2013.

## UN CASO DI OSTEOSARCOMA NEL GHEPPIO (*FALCO TINNUNCULUS*)

De Luca Bossa L.M.<sup>1</sup>, Dipineto L.<sup>2</sup>, Mennonna G.<sup>2</sup>, Meomartino L.<sup>2</sup>, Paciello O.<sup>2</sup>, Ciccarelli F.<sup>3</sup>, De Biase D.<sup>2</sup>, Raia P.<sup>3</sup>, Caputo V.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro di Riferimento Regionale di Igiene Urbana Veterinaria (CRIUV), Napoli;

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, via della Veterinaria 1, 80137, Napoli; <sup>3</sup>Centro Recupero Animali Selvatici "CRAS-Frullone", Via M. Rocco di Torrepadula, Napoli, Italy.

### Summary

Here we report a case of polyostotic chondroblastic osteosarcoma in a Kestrel (*Falco tinnunculus*) admitted to the Wildlife Rehabilitation and Rescue Centre of Naples. The bird showed a consolidated fracture of the left tibiotarsus bone and a deviation of the limb. After radiological, cytological and histopathological examinations, a diagnosis of polyostotic chondroblastic osteosarcoma was made. To our knowledge this is the first report on polyostotic chondroblastic osteosarcoma in a kestrel.

### CASE REPORT

Un giovane esemplare di gheppio veniva ricoverato presso il Centro di Recupero Animali Selvatici (CRAS) di Napoli. L'animale era incapace di volare e presentava difficoltà locomotorie. All'esame clinico appariva disidratato, denutrito e anemico. Era presente, inoltre, una frattura consolidata a livello tibiotarsico sinistro con deviazione dell'arto. Il gheppio veniva trattato con una soluzione salina standard e un complesso vitaminico. L'esame radiografico della zampa sinistra, eseguito in proiezione cranio-caudale, mostrava gravi lesioni morfostrutturali dell'epifisi distale del femore, della fibula, del tibiotarso e della porzione prossimale del tarsometatarso. Le lesioni erano caratterizzate da lisi permeativa diffusa e lievi reazioni periostali con ispessimento dei tessuti molli. Erano presenti, inoltre, una frattura patologica della diafisi distale dell'osso tibiotarsico sinistro e una frattura patologica della diafisi tarsometatarsica della zampa destra. Venivano effettuate delle biopsie nel sito delle lesioni, fissate in metanolo e colorate con il metodo Diff-Quik per la valutazione citologica.

All'esame citologico si osservavano rare e atipiche cellule fusiformi e cellule giganti multinucleate. Tali aspetti permettevano la diagnosi di osteosarcoma. A causa delle gravi condizioni, il volatile veniva sottoposto ad eutanasia. Successivamente, si eseguiva un esame necroscopico nel corso del quale non si osservavano metastasi a carico degli organi celomatici. Si raccoglievano, quindi, campioni dalle lesioni alle zampe che venivano posti in formalina al 10% per l'esame istopatologico. Le lesioni venivano sezionate e demineralizzate in acido tricloroacetico al 5%, incluse in paraffina e colorate con ematossilina-eosina e alcian blue-PAS.

A livello istologico, le lesioni erano rappresentate da proliferazione di cellule neoplastiche con coinvolgimento della cavità midollare e invasione della corteccia sovrastante. Le cellule neoplastiche variavano da fusiformi a pleomorfe con citoplasma basofilo, nuclei ipercromatici e nucleoli multipli. Erano presenti rare figure mitotiche. Le cellule giganti multinucleate erano simili agli osteoclasti ed erano sparse in tutto



il tumore; inoltre, filamenti ialini, eosinofili e tessuto osteoide erano disposti come trabecole irregolari separate da cellule maligne. Il tessuto osteoide era frammisto a matrice cartilaginea azzurra (alcian blue–PAS) ed era disposto irregolarmente come spicole tra piccole cellule fusiformi simili a cellule neoplastiche reticolari dello stroma del midollo osseo. Erano, inoltre, associati alla proliferazione neoplastica, lieve infiammazione ed emorragia. Pertanto, l'esame istopatologico evidenziava la presenza di osteosarcoma condroblastico.

## DISCUSSIONE

Le neoplasie sono segnalate frequentemente negli animali domestici e negli uccelli da gabbia malgrado siano rare nelle specie selvatiche<sup>1,2</sup>. L'osteosarcoma è un tumore maligno e aggressivo. Può presentarsi come tumore osseo primario con coinvolgimento dello scheletro assiale o appendicolare, o raramente avere origine dai tessuti molli (*i.e.* osteosarcoma extrascheletrico). Questo tipo di tumore è stato spesso riportato nell'uomo e negli animali, in particolare nei cani, come evento monostotico<sup>3</sup>. Negli uccelli, è stato descritto come un raro tumore riguardante lo scheletro appendicolare e, raramente, lo scheletro assiale<sup>4,5</sup>. Generalmente i sarcomi ossei sono stati segnalati in varie specie di uccelli degli Ordini Psittaciformes, Columbiformes, Ciconiiformes, Galliformes e Passiformes<sup>2,5</sup>. In base alle nostre conoscenze questa potrebbe essere la prima segnalazione di osteosarcoma condroblastico in un gheppio (*Falco tinnunculus*) allo stato selvatico. Infatti, sebbene siano riportati diversi casi di osteosarcoma negli uccelli<sup>2,6</sup>, la letteratura disponibile su queste neoplasie nei rapaci è scarsa e/o non aggiornata<sup>9,10</sup>.

## CONCLUSIONI

I tumori nelle specie selvatiche, sebbene raramente segnalati, dovrebbero essere inclusi nella diagnosi differenziale delle lesioni ossee nei rapaci.

## BIBLIOGRAFIA

1. Costagliola A, Britti D, Russo V, Meomartino L, Castagna F, Giordano D, Insabato L and O Paciello. (2011). Malignant melanoma in a seagull (*Larus fuscus*): morphological and immunohistochemical approach. *Avian Dis.* 55: 147-150.
2. Hartup BK and H Steinberg. (1996). Osteosarcoma in American robin (*Turdus migratorius*). *Avian Dis.* 40: 938-940.
3. Morello E, Martano M and P Buracco. (2011). Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. *Vet. J.* 189: 268-277.
4. Filippich LJ. (2004). Tumor control in birds. *Sem. Avian Exotic Pet Med.* 13: 25-43.
5. Reavill DR. Tumors of pet birds. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2004;7(3):537-560.
6. Fordham M, Rosenthal K, Durham A, Duda L and AM Komáromy. (2010). Intraocular osteosarcoma in an Umbrella Cockatoo (*Cacatua alba*). *Vet. Ophthalmol.* 13(Suppl. 1): 103-108.
9. Kostka V, Krautwald ME, Tellhelm B and B Schildger. (1988). A contribution to radiologic examination of bone alterations in psittacines, birds of prey and pigeons. *Proc. Assoc. Avian Vet.* 37-59.
10. Heidenreich M. (1997). Neoplasms. In: Heidenreich M (Ed.), *Birds of Prey: Medicine and Management*, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp. 219-220.

# QUALITÀ DELL'ACQUA IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI IN VENETO: CONFRONTO CHIMICO-FISICO E MICROBIOLOGICO TRA APPROVVIGIONAMENTO CON POZZO E CON ACQUEDOTTO

Di Martino G.<sup>1</sup>, Piccirillo A.<sup>2</sup>, Gallina A.<sup>1</sup>, Comin D.<sup>1</sup>, Capello K.<sup>1</sup>, Montesissa C.<sup>2</sup>, Bonfanti L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Legnaro (PD);

<sup>2</sup> Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università degli Studi di Padova;

## Summary

Limited data are available regarding the chemical-physical and microbiological quality of drinking water for turkeys in North-eastern Italy. Groundwater is frequently used as a source of supply and may be either unsuitable for drug dissolution and stability or be subjected to contaminant infiltration. Therefore, this study aimed at describing water quality in 14 turkey farms supplied with well water and 14 farms with aqueduct water. Salinity, hardness, pH, ammonia, sulphate, phosphate, nitrate, chromium, copper and iron were quantified in each sample. Total bacterial count at 22 °C and 37 °C, presence and enumeration of *Enterococcus* spp. and *E. coli*, and presence of *Campylobacter* spp. were evaluated. Water samples were collected twice per year (in winter and in summer) at 3 sampling sites: at the water source (A), in the tank where drugs are mixed for medicated water preparation (B) and at the nipple line (C). Results of chemical-physical analyses showed that the quality profile of both sources is frequently within the limit of tap water for human use. However, hardness ranged between 80-500 mg/l and in 70% of farms exceeded 200 mg/l. At site A no farms exceeded 1 mg/l of iron; however, at B-C sites one farm supplied with well water exceeded 1.3 mg/l in both seasons. At site A, microbiological quality of well and aqueduct water was mostly within the limit of tap water for human use. However, both sources had a poor microbiological quality at B and C sites (e.g. up to 4,400 CFU/100 ml of *E. coli* in well water and 1,300 CFU/100 ml in aqueduct water). *Campylobacter* spp. were rarely isolated; however, the prevalence of positivity by real time PCR was around 70% in both water sources. These preliminary findings indicate some criticisms in hardness and cleaning/disinfection procedures of pipeline, particularly in farms supplied with well water.

## INTRODUZIONE

Il regolamento 852/2004/CE stabilisce i requisiti per l'acqua di abbeverata nelle produzioni animali e precisa che deve risultare "potabile o pulita, al fine di prevenire la contaminazione delle specie allevate", ma non stabilisce alcun limite di accettabilità. La mancanza di disposizioni specifiche riguardo alla qualità dell'acqua di abbeverata rappresenta a oggi un rilevante punto critico per il benessere e la sanità animale in relazione alle qualità igienico-sanitarie dei prodotti da essi derivati: l'acqua proveniente da pozzi artesiani (comune fonte di approvvigionamento idrico) potrebbe risultare contaminata a causa di infiltrazione da parte di sostanze inorganiche, fertilizzanti, batteri, contaminanti e patogeni (Rossi e Gastaldo, 2005). Inoltre, acque non idonee potreb-

bero comportare anche riduzione delle prestazioni produttive, alterazione della qualità dei prodotti e danni alle attrezzature (Enne *et al.*, 2006).

Negli ultimi anni è aumentata l'attenzione sulla problematica connessa ai contaminanti chimici e biologici nell'alimentazione animale ed è stato recentemente svolto uno studio sulla qualità dell'acqua di abbeverata negli allevamenti suinicoli del Veneto (Giacomelli *et al.*, 2014), ma resta una sostanziale carenza scientifica riguardo alla qualità dell'acqua nel settore avicolo. L'importanza della quantità e qualità dell'acqua nell'alimentazione zootecnica viene spesso sottovalutata, in realtà l'acqua è essenziale, sia per quantità richieste sia per costanza dei fabbisogni, intimamente coinvolta in tutte le funzioni fisiologiche e metaboliche dell'organismo animale. Studi specifici hanno dimostrato che alcune caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua influenzano negativamente l'efficacia dei farmaci (antibatterici e antielmintici) quando somministrati in veicolo acquoso. In particolare, pH, durezza e salinità non idonei possono diminuire la solubilità dei principi attivi e favorire la precipitazione degli stessi come composti insolubili, causando un sottodosaggio del farmaco (Enne *et al.*, 2006), con la possibile comparsa di fenomeni di antibiotico-resistenza nelle popolazioni batteriche.

Per quanto riguarda invece la qualità microbiologica, l'EFSA ha recentemente indicato l'acqua di abbeverata come una delle cause di contaminazione diretta da *Campylobacter* spp. per animali e uomo (EFSA, 2011), e studi sul settore avicolo hanno riportato che la somministrazione di acqua di pozzo contaminata può essere il veicolo di introduzione di *Campylobacter* in allevamenti (Zimmer *et al.*, 2003; Pérez-Boto *et al.*, 2010). A questo riguardo sono ancora scarsi i dati disponibili, sebbene *Campylobacter* rappresenti un importante agente zoonotico, per il quale la direttiva 99/2003/CE raccomanda la definizione di opportuni programmi di sorveglianza.

Sulla base di queste motivazioni è stato attuato un progetto di ricerca per il monitoraggio della qualità dell'acqua di abbeverata in un campione di allevamenti di tacchini con approvvigionamento a pozzo e ad acquedotto, omogeneamente distribuiti nel territorio della Regione Veneto. Sono stati valutati durezza, pH, salinità, ferro, rame, indici di inquinamento agricolo quali ammoniaca, nitrati e solfati, quella di cationi indicatori di inquinamento industriale quali il cromo. È stata valutata anche la qualità microbiologica dell'acqua analizzando i seguenti parametri: cariche batteriche totali a 22 °C e 37 °C e presenza e conteggio di *E. coli* ed enterococchi, quali indicatori di inquinamento fecale. Il conteggio delle colonie batteriche a 22 °C è un indicatore di scarso significato sanitario, ma è utile per valutare l'efficacia del trattamento dell'acqua, o per valutare la pulizia e l'integrità del sistema idrico di distribuzione. Un incremento nel conteggio delle colonie batteriche a 37 °C può rappresentare un segnale precoce d'inquinamento antropico e una loro presenza elevata può essere causa di malattie come gastroenteriti e infezioni della cute e delle mucose, particolarmente in animali con compromissione del sistema immunitario (Bonato, 2007). Infine, è stato valutato il ruolo dell'acqua di abbeverata quale potenziale fonte di infezione da *Campylobacter* spp.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Allo studio hanno partecipato 28 allevamenti di tacchini della Regione del Veneto

(province di Padova, Treviso, Vicenza, Verona e Venezia), 14 dei quali riforniti con acqua di acquedotto e altrettanti con acqua di pozzo quale unica fonte per l'abbeverata degli animali. In ogni azienda sono stati raccolti campioni di acqua in tre punti: dalla sorgente di approvvigionamento (punto A), in corrispondenza del sistema di medicazione dell'acqua prima dell'ingresso nel capannone (punto B) e all'inizio della linea di abbeveratoi (punto C). I campionamenti sono stati effettuati due volte nell'anno solare 2012, in corrispondenza della stagione estiva e di quella invernale. Tutti i campioni sono stati prelevati in contenitori sterili e trasportati al laboratorio a temperatura di refrigerazione e immediatamente processati per l'analisi microbiologica, conservati in frigo e processati entro 48 ore per le analisi chimico-fisiche.

#### *Analisi chimico/fisiche*

Al momento del prelievo dal pozzo per ogni campione è stata registrata la profondità del pozzo di prelievo, la temperatura dell'acqua, il pH, la conducibilità e la salinità mediante sonda YSI Model 85 (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA).

La concentrazione di ammoniaca, è stata determinata attraverso spettrofotometrica all'indofenolo (APAT, 2003); la concentrazione dei nitrati e dei fosfati è stata determinata attraverso cromatografia ionica (APAT, 2003). La determinazione di cromo, rame e ferro è stata effettuata attraverso spettroscopia di assorbimento atomico (APAT, 2003).

#### *Esami microbiologici*

Le analisi microbiologiche sono state effettuate a partire da campioni di un litro di acqua, per la definizione della carica batterica totale a 22 °C e a 37 °C; inoltre, è stata effettuata la ricerca e conta di *Enterococcus* spp. e di *E. coli*, e la presenza di *Salmonella* spp. Non esistendo una normativa specifica per le acque di abbeverata, nel presente lavoro si è scelto di effettuare le analisi nel rispetto delle procedure ISO stabilite dalla Direttiva Europea 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano e recepite in Italia dal D.Lgs. n. 31/01 (Istituto Superiore di Sanità, 2007). La ricerca di *Campylobacter* spp. è stata effettuata su campioni di 2 litri di acqua. Ciascun campione, diviso in due aliquote da 1 litro, è stato analizzato con due diverse metodiche per il rilievo di *Campylobacter* spp.: isolamento in coltura e *real-time* PCR. Per l'isolamento in coltura di *Campylobacter* spp. i campioni sono stati processati seguendo i principi della metodica standard per il rilievo di *Campylobacter* termotolleranti dall'acqua (ISO 17995), alla quale sono state apportate lievi modifiche (SCA, 2002; Williams *et al.*, 2012). I campioni di acqua sono stati sottoposti a filtrazione attraverso una membrana sterile con pori del diametro di 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Germania) tramite un sistema di pompa a vuoto. Successivamente, ciascuna membrana singolarmente è stata inoculata in 50 ml di brodo di arricchimento selettivo Exeter (Mast Diagnostics, Merseyside, UK), e il campione ottenuto incubato a 41,5 °C in condizioni di microaerofilia. Dopo 48 ore di incubazione, un'aliquota (200 µl) di ciascuna brodocoltura è stata seminata su Karmali agar (OXOID, Basingstoke, UK), previa filtrazione passiva secondo la procedura descritta da Giacomelli *et al.* (2012). Le piastre sono state incubate per 48 ore a 41,5 °C in microaerofilia e quindi esaminate per la ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. Le colonie sospette sono state sottoposte a *multiplex end-point*

PCR per l'identificazione di genere e specie, secondo il protocollo di Yamazaki-Matsune *et al.* (2007).

Per la *real-time* PCR ciascuna aliquota è stata filtrata attraverso membrane sterili con pori del diametro di 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius). I filtri sono stati posti in provette con 5 ml di acqua deionizzata sterile e agitati vigorosamente. Un'aliquota di 3 ml della soluzione così ottenuta è stata centrifugata a 5.000 rpm per 10 minuti, mentre i rimanenti 2 ml sono stati conservati a -20 °C. Il *pellet* è stato risospeso in 200  $\mu\text{l}$  di PBS e sottoposto a estrazione del DNA utilizzando l'*High Pure Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Il DNA estratto è stato sottoposto a un saggio di *multiplex real-time* PCR con sonde Taqman® e *primer* specifici per *C. jejuni* e *C. coli*, come descritto da Toplak *et al.* (2012).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### *Analisi chimico/fisiche*

La salinità è equivalente ai solidi totali disciolti (STD), i quali vengono espressi come milligrammi di residuo fisso per litro di acqua dopo essiccamento a 180 °C. I campioni di acqua prelevati dai 14 pozzi nelle due stagioni presentavano un *range* di salinità compreso tra 129 mg/l e 758 mg/l; mentre i campioni di acquedotto tra 111 mg/l e 458 mg/l. Questi sono considerati valori limite per l'acqua di bevanda, dato che i primi effetti negativi sull'organismo sono evidenti con STD superiore a 3.000 mg/l (Rossi e Gastaldo, 2005; Enne *et al.*, 2006).

Tutti i campioni presentavano una durezza (contenuto di sali di calcio, magnesio e ioni disciolti come carbonati, bicarbonati, solfati, nitrati e cloruri) compresa tra 80 e 500 mg/l di  $\text{CaCO}_3$ , di cui circa il 70% superava i 200 mg/l. A questo riguardo è importante sottolineare che, in funzione anche di altri fattori, come il pH e la presenza di bicarbonato, l'acqua con una durezza superiore a 200 mg/L potrebbe causare depositi e incrostazioni di carbonato di calcio nei sistemi di distribuzione e sulle superfici di contatto e interferire con la dissoluzione e l'assorbimento di Tetracicline (Enne *et al.*, 2006; Bonato, 2007).

Per quanto riguarda il pH, tutti i campioni al punto A rientravano in un *range* di accettabilità, pari a valori compresi fra 6,7 e 8,6. Sono stati invece rilevati dei valori anomali (3,7) nei punti B e C del medesimo allevamento con pozzo durante la stagione estiva. In generale acque con pH al di fuori di questo *range* possono contribuire a una minore ingestione di acqua e alimento e, di conseguenza scadenti performance produttive, all'insorgenza di turbe del metabolismo e della fertilità, diarrea, oltre alla precipitazione di alcuni farmaci somministrati con l'acqua, con possibilità di tempi di sospensione prolungati e di presenza di residui di medicinali nelle carcasse (Rossi e Gastaldo, 2005; Enne *et al.*, 2006). Inoltre, anche se il pH è soltanto uno dei vari fattori che determinano il grado di corrosione, in generale più basso è il pH, più alta è la capacità di corrosione dell'acqua. Acque particolarmente acide (pH < 5-5,5) possono provocare negli animali problemi all'apparato urinario e digestivo, fenomeni di demineralizzazione e fragilità scheletrica oltre a essere causa di corrosione delle tubature (Enne *et al.*, 2006). La positività per ammoniaca a livelli superiori di 1 mg/ml è stata rilevata in inverno in due aziende con acquedotto e in 3 con pozzo; in estate solo in un allevamento con

acquedotto e uno con pozzo. Tali contaminazioni, che solo in un caso hanno raggiunto i 17 mg/l, possono derivare da impianti e condutture di cemento (per rilascio), oppure possono essere una conseguenza della disinfezione con clorammina o dell'acidificazione dell'acqua (Bonato, 2007).

In nessun allevamento il ferro presentava valori superiori a 1 mg/l nel punto A, mentre nei punti B e C in un allevamento con pozzo raggiungeva 1,5 mg/l in entrambe le stagioni. Il ferro è un contaminante naturale, ma in genere la sua concentrazione non supera gli 0,3 mg/l. In conseguenza del suo impiego come coagulante (per depurazione di acqua) il ferro può aumentare nell'acqua trattata e distribuita, così come in seguito al suo rilascio dalle tubature dei sistemi di distribuzione per corrosione delle stesse. Concentrazioni superiori a 2 mg/l possono ridurre il flusso idrico nelle tubature per fenomeni di flocculazione e accelerare il processo di degradazione di antibatterici come gli Aminoglicosidi; mentre a 5 mg/l il ferro può inattivare le Tetracicline (Bonato, 2007). La maggior parte degli allevamenti presentava valori di nitrati più bassi dei limiti stabiliti per l'acqua potabile a uso umano (50 mg/l). Tuttavia, in entrambe le stagioni e in tutti i punti di prelievo, tre allevamenti con pozzo presentavano concentrazioni di nitrati comprese tra 73 e 95 mg/l, mentre in inverno un allevamento con acquedotto presentava livelli tra 89 e 102 mg/l sempre in tutti i punti di prelievo. Nelle acque superficiali la concentrazione di nitrati è in genere ridotta (0-18 mg/l), ma può raggiungere diverse centinaia di mg/l in caso di contaminazione con acque di dilavamento di scariche di rifiuti, o con reflui di origine agricola, umana, animale e industriale. Infatti, l'incremento nell'uso di fertilizzanti, la produzione e lo smaltimento dei reflui animali rappresentano i principali fattori responsabili del progressivo aumento dei livelli di nitrati nelle acque (Bonato, 2007).

#### *Parametri microbiologici*

La carica batterica totale a 37 °C e 22 °C rilevata ai punti A ha dimostrato valori frequentemente più bassi dei valori limite stabiliti per l'acqua potabile a uso umano (rispettivamente <20UFC/ml e <100 UFC/ml). Tuttavia 4 allevamenti in estate (due con pozzo e due con acquedotto) e 5 in inverno (3 con pozzo e 2 con acquedotto) superavano tale limite. Nei punti B e C invece solo 2 allevamenti con pozzo in entrambe le stagioni e 7 allevamenti con acquedotto in inverno (4 dei quali anche in estate) hanno presentato valori conformi con i limiti dell'acqua potabile. Sia in estate sia in inverno il 29% degli allevamenti (14% con acquedotto e 43% con pozzo) presentava inquinamento con *E. coli* e/o Coliformi e/o Enterococchi nel punto A. Nei punti B e C, invece, questa percentuale di contaminazione raggiungeva valori tra il 50% (inverno) e il 79% (estate) degli allevamenti con pozzo e valori tra il 21% (inverno) e il 57% (estate) degli allevamenti con acquedotto con una carica di *E. coli* fino a 4.400 CFU/100ml nell'acqua di pozzo e di 1.300 CFU/100ml nell'acqua di acquedotto. Questo dato mette in luce la necessità di migliorare le procedure di sanificazione periodica delle tubazioni, in particolare negli allevamenti con acqua di pozzo. *Salmonella* spp. è stata isolata (*S. kentucky*) nel sito A di un unico allevamento a pozzo, sia in estate sia in inverno. La positività in *real-time* PCR per *Campylobacter* spp. è stata rilevata nei diversi punti di prelievo in 6 allevamenti con pozzo (43%) e 10 con acquedotto (71%) in estate; in 10 allevamenti con pozzo (71%) e 11 con acquedotto (79%) in inverno.



Il microrganismo è stato isolato solo in inverno nel punto B e C di un allevamento con pozzo (*C. jejuni*) e nel punto B di un allevamento con acquedotto (*C. coli*). La scarsa frequenza con la quale *Campylobacter* è stato isolato evidenzia il noto limite delle metodiche di isolamento di *Campylobacter* dall'acqua, che possono esitare in sottostima della presenza del microrganismo e risultati falsamente negativi. Ciò dipende dall'estrema suscettibilità del microrganismo la cui vitalità, e di conseguenza la possibilità di isolamento in coltura, si riduce rapidamente in seguito a variazioni anche minime delle condizioni chimico-fisiche del substrato nel quale si trova. Inoltre, nell'acqua *Campylobacter* può essere presente anche nella cosiddetta forma "vitale ma non coltivabile" (*viable but not-culturable*, VBNC), la quale comporta dei cambiamenti fisiologici e morfologici che gli permettono di sopravvivere anche in condizioni avverse (Rollins e Colwell, 1986) ma non rilevabili tramite coltura batterica. Per questi motivi, nel presente studio si è scelto di affiancare alla procedura di isolamento in coltura una metodica di biologia molecolare quale la *real-time* PCR, la quale, avendo come *target* il DNA del microrganismo, è in grado di rilevarne la presenza anche in condizioni di non coltivabilità. I risultati ottenuti confermano l'importanza dell'impiego di metodiche alternative a quelle classiche per la ricerca di *Campylobacter* nell'acqua.

## CONCLUSIONI

Complessivamente i dati chimico-fisici indicano delle possibili criticità per quanto riguarda la durezza dell'acqua, mentre i dati microbiologici evidenziano necessità di migliorare le procedure di sanificazione periodica delle tubazioni, in particolare negli allevamenti con pozzo.

Questi aspetti qualitativi dell'acqua rivestiranno una grande importanza per studi successivi volti a determinare il corretto dosaggio del farmaco in veicolo acquoso, tenendo in considerazione una possibile minore stabilità e solubilità del principio attivo e la massiva colonizzazione degli impianti da parte della microflora delle tubazioni.

*Campylobacter* spp. è stato isolato con frequenza molto sporadica, tuttavia ciò potrebbe essere imputato alla difficoltà di isolamento. Infatti, la positività in *real-time* PCR ha evidenziato elevati livelli di prevalenza in entrambe le tipologie di approvvigionamento, sia in estate sia in inverno.

## RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (RC IZSVe 10/11).

## BIBLIOGRAFIA

1. APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici. (2003). Metodi analitici per le acque. <http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/manuali-e-linee-guida/metodi-analitici-per-le-acque>.
2. Bonato A. (2007). Acqua e salute - Indicazioni tratte dalle linee guida dell'OMS



- sulla qualità dell'acqua destinata al consumo umano. A cura della Regione del Veneto. <http://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/acqua/file-e-allegati/documenti/acque-interne/acque-potabili/Bonato.pdf>
3. Enne G, Greppi G and M Serratori. (2006). Il ruolo dell'acqua nell'allevamento animale. *Italian J. Agron.* 3: 519-527.
  4. European Food Safety Authority. (2011). Scientific Opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA J.* 9(4): 2105.
  5. Giacomelli M, Andrighetto C, Lombardi A, Martini M and A Piccirillo. (2012). A longitudinal study on thermophilic Campylobacter spp. in commercial turkey flocks in Northern Italy: occurrence and genetic diversity. *Avian Dis.* 56: 693-700.
  6. Giacomelli M, Drigo M, Pasotto D, Piccirillo A, Menandro ML, Ribaud G, Zago G and C Montesissa. (2014). Studio baseline sulla qualità microbiologica e chimico-fisica dell'acqua di abbeverata in allevamenti suini in Veneto. Atti del XL Meeting annuale SIPAS, 27-28 marzo 2014, Montichiari (BS).
  7. Istituto Superiore di Sanità. (2007). Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici. Rapporti ISTISAN 07/5.
  8. Pérez-Boto D, García-Pena FJ, Abad-Moreno JC, Hurtado-Pizarro MD, Pérez-Cobo I and MA Echeita (2010). Drinking water as the source of Campylobacter coli infection in grandparent heavy breeders. *Avian Pathol.* 39: 483-487.
  9. Rollins DM and RR Colwell (1986). Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol.* 52: 531-538.
  10. Rossi P and A Gastaldo (2005). Un'abbeverata di qualità per animali in perfetta salute. *Agricoltura.* Luglio/agosto, 141-143.
  11. Standing Committee of Analysts (2002). The microbiology of drinking water – part 10 – Methods for the isolation of Yersinia, Vibrio and Campylobacter by selective enrichment, Nottingham, UK, The Environment Agency. <http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/mdwpart10.pdf>
  12. Toplak N, Kovač M, Piskernik S, Možina SS and B Jeršek (2012). Detection and quantification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli using real-time multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 112: 752-764.
  13. Williams LK, Sait LC, Cogan TA, Jørgensen F, Grogono-Thomas R and TJ Humphrey (2012). Enrichment culture can bias the isolation of Campylobacter subtypes. *Epidemiol Infect.* 140: 1227-1235.
  14. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N and T Tsukamoto (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari and Campylobacter upsaliensis. *J. Med. Microbiol.* 56: 1467-1473.
  15. Zimmer M, Barnhart H, Idris U and MD Lee (2003). Detection of Campylobacter jejuni strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. *Avian Dis.* 47: 101-107.

# VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ANTIBIOTICA DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE ALLEVATE E DA AVIFAUNA SELVATICA

Fiorentini L.<sup>1</sup>, Taddei R.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Parigi M.<sup>1</sup>, Vicari N.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>1</sup>, Tosi G.<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> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sezione Diagnostica di Bologna – Via P.Fiorini 5 – Bologna (BO).

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sezione Diagnostica di Pavia – Strada Campeggi 59/61 – Pavia(PV)

## Summary

The *in vitro* susceptibility to 18 antibiotics of 85 *Escherichia coli* strains (50 strains recovered from different wild bird species and 35 strains recovered from poultry farms) isolated in Emilia Romagna region in the period 2013-2014 was studied. Resistances to 16 antibiotics was observed (both in poultry species than in wild birds) and the following percentages of resistance (respectively for domestic and wild species) were obtained: penicillin G (100% and 100%), amoxicillin (68% and 21%), enrofloxacin (62% and 13%), ceftiofur (54% and 16%), tylosin (97% and 100%), tetracycline (84% and 30%), tilmicosin (100% and 100%), neomycin (16% and 5%), lincomycin/spectinomycin (81% and 70%), trimethoprim/sulfamethoxazole (38% and 12%), oxacillin (97% and 100%), erythromycin 97% and 100%), tiamulin (100% and 100%), lincomycin (100% and 100%), streptomycin (30% and 8%) and spectinomycin (69% and 64%). A significant correlation of the resistance of *E.coli* strains isolated from poultry was noted towards amoxicillin, ceftiofur, enrofloxacin and tetracycline. The intestinal tract of wild birds is a reservoir of antibiotic resistance *E.coli* strains and it is also remarkable that multiresistant *E.coli* isolates were detected both in poultry species than in wild birds.

## INTRODUZIONE

L'antibioticoresistenza è un fenomeno biologico naturale che si verifica per l'emergenza e la diffusione di fattori di resistenza batterica agli antibiotici ed è innescata ed amplificata dalla pressione selettiva esercitata sulle popolazioni microbiche attraverso l'uso di questi farmaci. L'utilizzazione inadeguata di antimicrobici terapeutici in medicina umana e veterinaria, l'impiego di queste molecole per fini non terapeutici (la cosiddetta "chemioprolifassi antibiotica") e l'inquinamento ambientale da antimicrobici accelerano la comparsa e la propagazione di microrganismi resistenti. Le maggiori criticità al momento riguardano i ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA), i ceppi di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) e i ceppi batterici Gram negativi (in particolare *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL/AmpC).

Il settore zootecnico è particolarmente coinvolto dal problema. L'Unione Europea e le autorità sanitarie nazionali hanno deciso di fronteggiare il problema attraverso misure

restrittive ma soprattutto incentivando un impiego “prudente e ragionato” dell’utilizzo degli antibiotici (1,2). E’ inoltre necessario implementare le misure di biosicurezza e, laddove possibile, di profilassi immunizzante nonché il ricorso a prodotti alternativi. Tra i paesi europei maggiormente attivi nella riduzione dell’uso degli antibiotici in medicina veterinaria, l’Olanda ha adottato fin dal 2008 un programma che si prefigge un calo del 70% delle vendite di antibiotici nel settore zootecnico alla fine del 2015 (prendendo come riferimento i quantitativi venduti nel 2009) (7). Il programma olandese classifica gli antibiotici nelle seguenti categorie:

- Prima scelta: comprende antibiotici per i quali non si prevede una limitazione all’impiego purchè quest’ultimo sia ovviamente destinato esclusivamente a scopi terapeutici. Vi appartengono alcune beta-lattamine (come ad esempio la penicillina G e la penicillina V), le tetraciline, i sulfamidici (anche associati al trimethoprim), i fenicoli (tiamfenicolo e florfenicolo) alcuni macrolidi (ad esempio la tilosina ma non nel settore avicolo), le pleuromutiline, la rifaximina, la bacitracina e l’avilamicina.
- Seconda scelta: il loro impiego va giustificato in funzione della diagnosi e dell’applicazione di test di sensibilità *in vitro*. Questi ultimi si possono evitare solo per terapie di emergenza. Vi appartengono alcune beta-lattamine (amoxicillina, ampicillina, acido clavulanico) alcune cefalosporine (come cefalexina e cefapirina), alcuni macrolidi (come la tilosina e la tilmicosina per le specie avicole e la tulatromicina), alcuni aminoglicosidi (apramicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, streptomina, spectinomicina) e alcuni fluorochinoloni (flumequina, acido oxolinico).
- Terza scelta: vi appartengono antibiotici considerati di importanza critica per la salute umana. Il loro impiego in ambito veterinario va riservato a terapie individuali come conseguenza di indagini batteriologiche seguite da prove di sensibilità *in vitro* e in assenza di alternative. Questo gruppo comprende alcune cefalosporine (cefoperazone, ceftiofur e cefquinome) e alcuni fluorochinoloni (tra cui enrofloxacin e marbofloxacin).
- E’ infine vietato l’impiego degli antibiotici non inclusi nelle categorie appena descritte. In particolare il divieto si riferisce agli antibiotici non inclusi nella tabella 1 del Regolamento CE 37/2010 (che stabilisce l’elenco delle sostanze farmacologicamente attive consentite e ne fissa i limiti massimi residuali negli alimenti di origine animale) oppure elencati (come sostanze proibite) nella tabella 2 del medesimo regolamento (8).

A livello diagnostico è fondamentale un’attività costante di studio delle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi batterici isolati al fine di valutare nel tempo l’andamento del fenomeno e di evidenziare tempestivamente la comparsa di nuove problematiche. Questa attività deve comprendere sia le specie allevate che la fauna selvatica.

Il presente studio si è indirizzato sullo studio delle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi di *Escherichia coli* isolati da specie avicole allevate e da specie appartenenti alla avifauna selvatica.

*Escherichia coli* è un normale costituente della flora intestinale dell’uomo e della maggior parte delle specie animali, sia domestiche che selvatiche. Può essere

facilmente disseminato in svariati ecosistemi attraverso acqua, terreno e alimenti. Questo microrganismo è frequentemente implicato in patologie enteriche e sistemiche (di interesse umano e veterinario) per la cui terapia è spesso richiesto l'impiego di antibiotici. Di conseguenza non è infrequente la comparsa di fenomeni di antibiotico-resistenza tra cui particolare importanza viene attribuita ai ceppi produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL/AmpC) resistenti agli antibiotici beta-lattamici e, in particolare, ad alcune penicilline e cefalosporine.

*Escherichia coli* è considerato il più diffuso tra i batteri patogeni aviari. Colpisce infatti tutte le specie allevate, a qualsiasi età e in tutte le tipologie produttive. E' solitamente responsabile di infezioni sistemiche (favorite da fattori condizionanti di natura virale e/o ambientale) e, più raramente, di infezioni localizzate (quali ad esempio il coligranuloma o malattia di Hjarre). L'infezione da *Escherichia coli* è responsabile di gravi perdite economiche legate agli indici di mortalità, alla riduzione delle performance zootecniche e all'aumento degli scarti in fase di macellazione.

L'avifauna selvatica svolge un ruolo importante nella diffusione dell'antibiotico-resistenza in vari modi:

- Come "sentinella" in grado cioè di colonizzare, in funzione dell'habitat di appartenenza, ceppi batterici antibiotico-resistenti provenienti da attività umane o allevamenti zootecnici.
- Come "serbatoio" e potenziale diffusore (in particolare per le specie migratorie) di ceppi antibiotico-resistenti.
- Come possibile fonte di antibiotico-resistenza per l'uomo e le specie animali allevate.

## **MATERIALI E METODI**

### Campionamento/Specie avicole allevate

Per questo studio sono stati impiegati 35 ceppi di *Escherichia coli* isolati e identificati dalle principali specie avicole allevate in Emilia Romagna. In particolare sono stati impiegati, nel 2013, 9 ceppi di *Escherichia coli* isolati da allevamenti di polli da carne (3 ceppi), tacchini da carne (3 ceppi), quaglia, faraona e anatra (1 ceppo ciascuno). Sono stati inoltre impiegati 26 ceppi di *Escherichia coli* isolati nel 2014 dalle seguenti specie e tipologie produttive: pollo da carne (13 ceppi), tacchino da carne (6 ceppi), gallina ovaiole da consumo (3 ceppi), riproduttori pesanti di pollo (3 ceppi) e quaglia (1 ceppo).

Sono stati considerati casi clinici di colibacillosi (caratterizzati da lesioni macroscopiche di natura fibrinosa coinvolgenti differenti organi tra cui fegato, milza, pericardio e, negli animali in deposizione, ovaio e ovidutto) e casi clinici di altra natura ma caratterizzati anch'essi dall'isolamento di ceppi di *Escherichia coli* a diffusione sistemica.

### Campionamento/Avifauna selvatica

Per questo studio sono stati impiegati 50 ceppi (28 riferiti al 2013 e 22 riferiti al 2014) di *Escherichia coli* isolati e identificati dalle seguenti specie selvatiche: gazza (*Pica pica*, 18 ceppi), Ghiandaia (*Garrulus glandarius*, 16 ceppi), gabbiano (*Larus melanocephalus*, 3 ceppi), civetta (*Athene noctua*, 2 ceppi), cornacchia (*Corvus cornix*, 2 ceppi), gallinella d'acqua (*Gallinula chloropus*, 1 ceppo), gruccione (*Meros apiaster*, 1 ceppo), sparviero (*Accipiter nisus*, 1 ceppo), martin pescatore (*Alcedo atthis*, 1

ceppo), storno (*Sturnus vulgaris*, 1 ceppo), tarabusino (*Ixobrychus minutus*, 1 ceppo), gufo (*Asio otus*, 1 ceppo), rondone (*Apus apus*, 1 ceppo), falco (Gen. *Falco*, 1 ceppo). I ceppi impiegati nello studio sono stati isolati e identificati da carcasse recuperate sul territorio regionale dalle autorità competenti oppure provenienti da centri di raccolta e recupero autorizzati. In tutti i casi considerati si trattava di soggetti privi di lesioni anatomico-patologiche riferibili a colibacillosi. L'isolamento di *Escherichia coli* veniva perciò eseguito dal contenuto intestinale.

#### Prove batteriologiche e test di sensibilità antibiotica in vitro

Per l'isolamento dei ceppi di *Escherichia coli* sono stati utilizzati terreni selettivi e differenziali. Una volta in coltura pura i ceppi sono stati identificati su base biochimica mediante l'impiego di test miniaturizzati (Microgen®, Biogenetics). Sui ceppi isolati sono state condotte prove in vitro di sensibilità agli antibiotici attraverso la tecnica della Minima Concentrazione Inibente (MIC). Per la prova è stato impiegato un sistema standardizzato (MIC AVIPRO PLATE®, LohmannTierzucht GmbH) progettato per la medicina veterinaria ed in particolare, per la patologia aviaria, costituito da pannelli (piastre microtiter a 96 pozzetti) contenenti 1 µg di diversi antibiotici disidratati di impiegati sia in campo umano che veterinario. Gli antibiotici utilizzati (e la relativa abbreviazione) sono i seguenti: Amoxicillina (AMX), Colistina (COL), Cefotiofur (CET), Enrofloxacin (ENR), Eritromicina (ERY), Lincomicina (LIN), Lincomicina/Spectinomicina (LIS), Neomicina (NEO), Oxacillina (OXA), Penicillina G (PEN), Rifampicina (RAM), Spectinomicina (SPT), Streptomina (STR), Tetraciclina (TET), Tiamulina (TIA), Tilmicosina (TILM), Tilosina (TLS), Trimethoprim/sulfametossazolo (T/S).

Gli antibiotici impiegati appartengono alle seguenti categorie: beta-lattamici (penicillina G, amoxicillina, oxacillina e cefotiofur), tetraciclina (tetraciclina), macrolidi (tilosina, tilmicosina, eritromicina), aminoglicosidi (neomicina, streptomina, spectinomicina), fluorochinoloni (enrofloxacin), pleuromutiline (tiamulina), lincosamidi (lincomicina), sulfonamidi (trimethoprim+sulfametossazolo), rifamicine (rifampicina), polimixine (colistina) e lincosamidi+aminoglicosidi (lincomicina+spectinomicina).

Il test è progettato per determinare la minima concentrazione inibente nei confronti di batteri Gram positivi e Gram negativi. Per la definizione della sensibilità nei confronti degli antibiotici sono stati considerati i *breakpoints* forniti dal kit e riferiti alle performance di un ceppo di riferimento di *Escherichia coli* (ATCC 25922). Nel dettaglio i valori di *breakpoint* considerati (espressi in µg/ml) sono i seguenti: Penicillina G: >2 (resistente); Amoxicillina: 8 (intermedio); Enrofloxacin: ≤0,25 (sensibile); Cefotiofur: ≤ 2 (sensibile); Tilosina: ≤0,25 (sensibile); Tetraciclina: ≤ 2 (sensibile); Tilmicosina: >16 (resistente); Neomicina: ≤ 8 (sensibile); Lincomicina+spectinomicina: ≤ 8/32 (sensibile); Trimethoprim+sulfametossazolo: ≤ 0,5/9,5 (sensibile); Oxacillina: >2 (resistente); Colistina: ≤ 2 (sensibile); Eritromicina: >4 (resistente); Tiamulina: >16 (resistente); Lincomicina: >4 (resistente); Streptomina: ≤200 (sensibile); Rifampicina: ≤50 (sensibile); Spectinomicina: ≤ 32 (sensibile).

La metodica impiegata si può riassumere nel modo seguente:

è stato allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame a partire da una sospensione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario di 0,5. In seguito la metodica prevedeva le fasi seguenti:

- centrifugazione della sospensione per 2-3 secondi.
- Inoculazione di 100 µl di sospensione standardizzata in 11 ml di Mueller Hinton Broth.
- Inoculazione di tutti i pozzetti del pannello MIC AVIPRO PLATE® con 100 µl di sospensione batterica per pozzetto.
- Incubazione per 18-24 ore a 37°C in aerobiosi.
- Lettura dei risultati: la MIC è stata calcolata come la più alta diluizione dell'antibiotico che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico le MIC sono state definite come maggiori-uguali ( $\geq$ ) rispetto alla concentrazione più alta. Quando non si verificava crescita batterica in tutte le concentrazioni, le MIC sono state considerate come minori o uguali ( $\leq$ ) rispetto alla concentrazione più bassa.

### Analisi statistica

La correlazione tra la resistenza agli antibiotici dei ceppi isolati da fauna selvatica e di quelli isolati da specie domestiche allevate è stata calcolata mediante test esatto di Fisher (GraphPad Software: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/catMenu>). Un P-value <0,05 (test a due code) è stato considerato come statisticamente significativo.

## **RISULTATI**

I risultati sono riportati nelle tabelle 1,2 e 3. Di seguito vengono riportati i risultati dello studio suddivisi in base alle categorie di appartenenza degli antibiotici considerati nel presente lavoro:

**BETA-LATTAMICI:** il meccanismo d'azione degli antibiotici appartenenti a questo gruppo si basa sull'inibizione della sintesi della parete cellulare batterica. Nell'ambito di questo gruppo esiste distinzione tra antibiotici che agiscono solo nei confronti dei batteri Gram positivi e antibiotici ad ampio spettro. Al primo gruppo appartengono, tra le molecole studiate nel presente lavoro, penicillina G e oxacillina (nei cui riguardi i ceppi di *E.coli* testati hanno infatti manifestato una resistenza pressochè totale), mentre nel secondo gruppo rientrano amoxicillina e ceftiofur (quest'ultimo appartenente alla classe delle cefalosporine). Nei confronti dell'amoxicillina lo studio ha messo in evidenza una resistenza del 68% e del 54% dei ceppi testati (isolati rispettivamente da specie domestiche e selvatiche). Nei confronti del ceftiofur la percentuale di resistenza è stata del 19% e del 8% dei ceppi testati (isolati rispettivamente da specie domestiche e selvatiche). La resistenza a queste due molecole è risultata significativamente correlata ai ceppi isolati da specie domestiche allevate.

**FLUOROCHINOLONI:** lo studio ha messo in evidenza un elevato numero di ceppi di *E.coli* isolati in ambito zootecnico resistenti al principio attivo enrofloxacin (62%). Appare inoltre interessante il riscontro di resistenza sul 13% dei ceppi isolati da specie selvatiche; la resistenza all'enrofloxacin è risultata significativamente correlata ai ceppi isolati da specie domestiche.

**SULFONAMIDI:** lo studio ha evidenziato una resistenza all'associazione trimethoprim+sulfametossazolo del 38% dei ceppi isolati da specie allevate e del 12% dei ceppi isolati da avifauna selvatica. Tale associazione è di largo impiego in avicoltura soprattutto nell'allevamento del pollo da carne.

**POLIMIXINE:** l'unica molecola appartenente a questo gruppo considerata nello studio



è la colistina sicuramente uno tra gli antibiotici di maggior utilizzo nel settore avicolo. La resistenza nei confronti delle polimixine è molto rara ed è stata segnalata solo nei confronti di *Salmonella* spp. I risultati dello studio confermano questo dato.

**AMINOGLICOSIDI:** le tre molecole appartenenti a questo gruppo considerate in questo lavoro (neomicina, streptomina e spectinomicina) hanno presentato livelli di resistenza differenti (16%, 30% e 69% nelle specie domestiche; 5%, 8% e 64% in quelle selvatiche). E' noto tuttavia che fenomeni di cross-resistenza all'interno di questa categoria non sono frequenti (a differenza ad esempio di sulfonamidi e fluorochinoloni). E' interessante notare come i livelli più alti di resistenza riguardino la spectinomicina, ampiamente utilizzata (a differenza di neomicina e streptomina) nel settore avicolo spesso in associazione con altri antibiotici (lincomicina, tilosina).

**TETRACICLINE, LINCOSAMIDI, PLEUROMUTILINE e MACROLIDI:** come era logico attendersi (data la scarsa efficacia di questi antibiotici nei confronti di *Escherichia coli*) la resistenza dei ceppi batterici testati in questo lavoro è risultata totale nei confronti di lincomicina e tilmicosina, mentre la maggior parte dei ceppi è risultata resistente a tilosina, eritromicina, tiamulina e tetraciclina. Questa tendenza è stata riscontrata sia nei ceppi "domestici" che "selvatici".

**RIFAMICINE:** tutti i ceppi isolati sia da specie domestiche che selvatiche si sono rivelati sensibili alla rifampicina. Questo antibiotico non viene impiegato nel settore avicolo.

**CEPPI MULTIRESISTENTI:** sono state riscontrate resistenze multiple nei ceppi di *Escherichia coli* testati nel presente lavoro. Il fenomeno è stato osservato sia in ceppi isolati da specie allevate che in ceppi isolati da avifauna selvatica. In particolare, nell'ambito delle molecole efficaci nei confronti dei Gram negativi, va segnalata la resistenza ad almeno un beta lattamico ad ampio spettro (amoxicillina e/o ceftiofur) associata a quella nei confronti dei fluorochinoloni (enrofloxacin) in 19 ceppi su 35 isolati da specie domestiche (54%). Tra questi, 8 ceppi (23% sul totale degli esaminati) evidenziavano una resistenza anche nei confronti di almeno un aminoglicoside e 10 ceppi (35% sul totale degli esaminati) presentavano una resistenza estesa anche all'associazione trimethoprim+sulfametossazolo. Un ceppo presentava infine una resistenza multipla "beta-lattamici ad ampio spettro+trimethoprim+sulfametossazolo+aminoglicosidi". L'associazione della resistenza a beta-lattamici ad ampio spettro e fluorochinoloni veniva osservata anche in 5 ceppi su 50 (10%) isolati da avifauna selvatica. Tra questi ultimi un ceppo presentava una resistenza estesa anche ad almeno un aminoglicoside, mentre due ceppi evidenziavano una resistenza anche nei confronti dell'associazione trimethoprim+sulfametossazolo.

## **DISCUSSIONE**

Antibiotico-resistenza di *E.coli* isolati da specie avicole allevate: lo studio ha dimostrato la presenza di fenomeni di resistenza nei confronti di 16 molecole su 18 considerate nello studio. Tra le molecole impiegate nel settore avicolo solo la colistina ha evidenziato una totale efficacia *in vitro*. La resistenza alle polimixine è rara. Tuttavia secondo le indicazioni dell'Health Council olandese anche per l'uso di questa molecola andrà prevista una graduale riduzione limitata attualmente dalla mancanza di alternative adeguate (7). Appaiono preoccupanti i livelli di resistenza nei confronti



di beta-lattamici ad ampio spettro, fluorochinoloni, aminoglicosidi (soprattutto per quanto riguarda la spectinomina), macrolidi e sulfonamidi. Questa preoccupazione riguarda sia il comparto zootecnico che le possibili ripercussioni per la salute pubblica. Nel primo caso perché si tratta di molecole ampiamente utilizzate nella terapia delle infezioni batteriche, la cui perdita di efficacia può comportare seri problemi soprattutto per la mancanza di valide alternative. Tuttavia gli elevati livelli di resistenza nei confronti di questi antibiotici possono essere la diretta conseguenza proprio del loro massiccio impiego, in passato, spesso in modo irrazionale (ad esempio amoxicillina, trimetoprim+sulfonamidi, tilosina e aminoglicosidi frequentemente impiegati nella cosiddetta “chemioprophylassi”).

Nel secondo caso (l’impatto cioè sulla sanità pubblica) gli aspetti da considerare sono i seguenti:

- Amoxicillina e ceftiofur sono tra i beta-lattamici che possono influenzare la comparsa di ceppi ESBL/AmpC, considerata una delle principali emergenze della antibiotico-resistenza in campo umano.
- La resistenza nei confronti degli aminoglicosidi può compromettere (essendo molto frequenti i fenomeni di resistenza crociata) l’efficacia di antibiotici appartenenti a questo gruppo considerati di importanza critica per la salute pubblica (amikacina, arbekacina, gentamicina, netilmicina, tobramicina e streptomina).
- Fluorochinoloni: anche in questo caso fenomeni di resistenza crociata possono compromettere l’efficacia di antibiotici considerati di importanza cruciale nella terapia di alcune infezioni batteriche nell’uomo.
- I macrolidi, pur non influenzando la comparsa di ceppi ESBL/AmpC, sono considerati di prima scelta nel trattamento di alcune infezioni umane tra cui *Legionella* spp., *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp.. L’impiego irrazionale di questi antibiotici in allevamento potrebbe aumentare il rischio di diffusione di ceppi di *Campylobacter* resistenti. Va infatti ricordato che le specie avicole rappresentano uno dei principali serbatoi di questo microrganismo.

Antibiotico-resistenza di *E.coli* isolati da avifauna selvatica: la prima segnalazione di fenomeni di antibiotico-resistenza nella fauna selvatica ha riguardato proprio una specie aviaria (piccione) e risale al 1978 (9). Da allora altri studi hanno evidenziato questo fenomeno in diverse specie (anatre, oche, rapaci, cormorani, gabbiani, tortore e passeriformi) in varie zone del pianeta (3,5,6). Nel nostro paese l’unico studio riportato in letteratura riguarda la descrizione di ceppi di *Escherichia coli* dotati di antibiotico-resistenza isolati da gabbiani in Puglia (4). Nel presente lavoro è stata considerata un’ampia varietà di specie selvatiche (sia stanziali che migratorie) recuperate in diverse zone dell’Emilia Romagna. I ceppi di *Escherichia coli* isolati da queste specie hanno presentato fenomeni di antibiotico-resistenza coincidenti (sia pure con livelli di prevalenza inferiori) con quelli riscontrati nelle specie domestiche allevate. Questa correlazione è risultata significativa, nei ceppi isolati in allevamento, per amoxicillina, ceftiofur, enrofloxacin e tetraciclina. Sono diversi i fattori che contribuiscono alla presenza di fenomeni di antibiotico-resistenza tra le specie selvatiche in una determinata area geografica. Il più importante riguarda il grado di associazione con le attività umane. Gli habitat dove più frequentemente sono stati dimostrati fenomeni

di antibiotico-resistenza nelle specie selvatiche includono infatti attività zootecniche, discariche e impianti di depurazione delle acque. L'utilizzo della pollina come fertilizzante rappresenta un altro fattore di rischio. Da non sottovalutare infine il ruolo degli uccelli migratori nel veicolare e disseminare ceppi antibiotico-resistenti per lunghe distanze in un periodo di tempo relativamente breve.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. AAVV (2012). Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia. [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1683\\_allegato.PDF](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1683_allegato.PDF)
2. AAVV (2015). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. EFSA journal 13:4006-4120.
3. Bonnedahl J., Hernandez J., Stedt J., Wladenstrom J., Olsen B., Drobni M. (2014). Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in gulls, Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases* 20:897-899.
4. Camarda A., Circella E., Pennelli D., Madio A., Bruni G., Lagrasta V., Marzano G., Mallia E., Campagnari E. (2006). Wild birds as biological indicators of environmental pollution: biotyping and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from Audouin' gulls (*Larus audouinii*) living in the Bay of Gallipoli (Italy). *Italian Journal of Animal Science* 5:287-290.
5. Cole D., Drum D.J., Stalknecht D.E., White D.G., Lee M.D., Ayers S. (2005). Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 11:935-938.
6. Costa D., Poeta P., Saenz Y., Vinue L., Coelho A.C., Matos M., Rojo Bezares B., Rodrigues J. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microbial drug resistance* 14:72-77.
7. Health Council of the Netherlands (2011). Antibiotic in food animal production and resistant bacteria in humans – n.2011/16 The Hague.
8. Regolamento CE n.37/2010 del 22 dicembre 2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale. GU L15 del 20.1.2010 pag.1.
9. Sato G., Oka C., Asagi M., Ishiguro N. (1978). Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 241:407-417.

Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della ricerca corrente IZSLER PRC2011/010 "ricerca e caratterizzazione di nuovi microorganismi appartenenti alla famiglia delle *Chlamydiaceae* e di *Escherichia coli* in allevamenti avicoli, avifauna selvatica e volatili d'affezione".

Tabella 1: riepilogo sensibilità antibiotica dei ceppi isolati da specie avicole allevate nell'intero periodo (2013-2014)

	<b>PEN</b>	<b>AMX</b>	<b>ENR</b>	<b>CET</b>	<b>TLS</b>	<b>TET</b>	<b>TILM</b>	<b>NEO</b>	<b>LIS</b>	<b>T/S</b>	<b>OXA</b>	<b>COL</b>	<b>ERY</b>	<b>TIA</b>	<b>LIN</b>	<b>STR</b>	<b>RAM</b>	<b>SPT</b>
n.ceppi RESISTENTI (%)	35 (100)	24 (68)	22 (62)	19 (54)	34 (97)	30 (84)	35 (100)	6 (16)	28 (81)	14 (38)	34 (97)	0	34 (97)	35 (100)	35 (100)	10 (30)	0	24 (69)
n.ceppi SENSIBILI (%)	0	11 (32)	13 (38)	16 (46)	1 (3)	5 (16)	0	29 (84)	7 (19)	21 (62)	1 (3)	35 (100)	1 (3)	0	0	25 (70)	35 (100)	11 (31)

Tabella 2: riepilogo sensibilità antibiotica dei ceppi isolati da specie avicole selvatiche nell'intero periodo (2013-2014)

	<b>PEN</b>	<b>AMX</b>	<b>ENR</b>	<b>CET</b>	<b>TLS</b>	<b>TET</b>	<b>TILM</b>	<b>NEO</b>	<b>LIS</b>	<b>T/S</b>	<b>OXA</b>	<b>COL</b>	<b>ERY</b>	<b>TIA</b>	<b>LIN</b>	<b>STR</b>	<b>RAM</b>	<b>SPT</b>
n.ceppi RESISTENTI (%)	50 (100)	11 (21)	6 (13)	8 (16)	50 (100)	15 (30)	50 (100)	3 (5)	35 (70)	6 (12)	50 (100)	0	50 (100)	50 (100)	50 (100)	4 (8)	0	32 (64)
n.ceppi SENSIBILI (%)	0	39 (79)	44 (88)	42 (84)	0	35 (70)	0	47 (95)	15 (30)	44 (88)	0	50 (100)	0	0	0	46 (92)	50 (100)	18 (36)

Tab.3: Correlazione tra la resistenza agli antibiotici dei ceppi isolati da fauna selvatica ed allevamento (Pvalue calcolato con test esatto di Fisher).

<b>Antibiotico</b>	<b>Pvalue</b>
PEN	1,00
AMX	<0,0001*
ENR	<0,0001*
CET	0,0003*
TLS	1,00
TET	<0,0001*
TILM	1,00
NEO	0,15
LIS	0,33
T/S	0,01
OXA	0,41
COL	1,00
ERY	0,41
TIA	1,00
LIN	1,00
STR	0,02
RAM	1,00
SPT	0,49

\*Percentuali di resistenza associate in modo statisticamente significativo agli isolati da allevamento

# IDENTIFICAZIONE MEDIANTE *NEXT GENERATION SEQUENCING* DI SOTTOPOPOLAZIONI VIRALI IN UN VACCINO VIVO ATTENUATO PER METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO B E LORO IMPLICAZIONE NEL FENOMENO DI REVERSIONE A VIRULENZA

Franzo G.<sup>1</sup>, Naylor C.J.<sup>2</sup>, Drigo M.<sup>1</sup>, Croville G.<sup>3</sup>, Ducatez M.F.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>4</sup>, Laconi A.<sup>4</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD);*

<sup>2</sup> *Department of Infection Biology, University of Liverpool, Leahurst Campus, Neston, Cheshire, CH64 7TE – United Kingdom;*

<sup>3</sup> *INRA and Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1225 IHAP, F-31076, Toulouse, France;*

<sup>4</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO)*

## Summary

Avian metapneumovirus (aMPV) infects respiratory and reproductive tracts of domestic poultry, often involving secondary infections, and leads to serious economic losses in most parts of the world. While in general disease is effectively controlled by live vaccines, reversion to virulence of those vaccines has been demonstrated on several occasions. Consensus sequence mutations involved in the process have been identified in more than one instance. In one previous subtype A aMPV candidate vaccine study, small subpopulations were implicated. In the current study, the presence of subpopulations in a subtype B vaccine was investigated by deep sequencing. Of the 19 positions where vaccine and progenitor consensus sequences differed, subpopulations were found to have sequence matching progenitor sequence in 4 positions. However none of these mutations occurred in a virulent revertant of that vaccine, thereby demonstrating that the majority progenitor virus population had not survived the attenuation process, hence were not obviously involved in any return to virulence. However within the vaccine, a single nucleotide variation was found which agreed with consensus sequence of a derived virulent revertant virus, hence this and other undetected, potentially virulent subpopulations, cannot totally be discounted from being involved in reversion. Much deeper sequencing of progenitor, vaccine and revertant may clarify whether problematic virulent subpopulations are present and therefore whether these need to be routinely removed during aMPV vaccine preparation prior to registration and release.

## INTRODUZIONE

Il metapneumovirus aviare (aMPV) è un patogeno di grande importanza per l'industria avicola, in quanto in grado di determinare sindromi respiratorie sia nel tacchino che nel pollo che se complicate da infezioni batteriche secondarie possono conseguire in rilevanti perdite economiche (7).

Alla fine degli anni '80 sono stati messi in commercio vaccini vivi attenuati che hanno permesso il controllo di tali infezioni. Tuttavia in campo si osservano ancora forme respiratorie riferibili ad aMPV (2, 5). Ciò è stato imputato a diverse cause tra cui la vaccinazione mal praticata, scarsa durata dell'immunità e incompleta protezione tra i sottotipi (11, 15).

Diversi studi hanno inoltre dimostrato la possibilità di fenomeni di reversione a virulenza di questi vaccini e riportato, sia per vaccini allestiti con aMPV sottotipo A e sottotipo B, i siti coinvolti in questo fenomeno (3, 4). Sebbene la presenza di sottopopolazioni vaccinali caratterizzate da una diversa virulenza sia stata riportata per il sottotipo A (12), questo non preclude il concomitante ruolo di una progressiva evoluzione con acquisizione di mutazioni dei ceppi vaccinali durante la catena di trasmissione *in vivo*. Nel presente studio, un vaccino basato su aMPV sottotipo B è stato sottoposto a *deep sequencing* tramite protocolli di *Next Generation Sequencing* (NGS) al fine di identificare e studiare la presenza di sottopopolazioni virali potenzialmente implicate nel fenomeno di reversione a virulenza.

## MATERIALI E METODI

### *Vaccino aMPV sottotipo B*

Un flacone di vaccino aMPV sottotipo B (ceppo VCO3/50) è stato risospeso in 2 mL di acqua per biologia molecolare. L'RNA è stato estratto da 200 $\mu$ L di sospensione virale utilizzando il kit High pure Viral RNA kit (Roche Diagnostics, Italia). Durante questa fase è stata anche prevista una fase di digestione del DNA.

### *Next Generation Sequencing*

Al fine di limitare il possibile bias legato alla processione del campione, sono stati utilizzati 2 distinti protocolli di preparazione delle librerie utilizzate poi per il sequenziamento.

*Protocollo 1.* Il primo protocollo ha previsto l'amplificazione del campione di partenza tramite RT-PCR. L'intero genoma di aMPV è stato retro trascritto in un'unica reazione utilizzando il kit Maxima H Minus Reverse kit (Thermo Scientific, Italia). Il cDNA così ottenuto è stato poi amplificato utilizzando il kit Phusion Hot Start II High Fidelity Polymerase Kit (Thermo Scientific, Italia) con il fine di ottenere 2 amplificati parzialmente sovrapposti (approssimativamente 7000bp per ciascun frammento) che includessero l'intera sequenza codificante del genoma virale. I prodotti così ottenuti, previa purificazione, sono stati inviati a MACROGEN per il successivo sequenziamento. La libreria, preparata tramite il Nextera DNA XT kit, è stata sequenziata (100bp *paired-end*) utilizzando il sequenziatore Illumina HiSeq.

*Protocollo 2.* Il secondo protocollo ha previsto l'esecuzione di una two-step RT-PCR utilizzando *random hexamer primers* recanti una sequenza *tag* comune al fine di amplificare in modo casuale tutto l'RNA del campione, fornendo contestualmente gli "adaptor" necessari per la successiva fase di PCR. I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio e le bande di dimensione di approssi-

mativamente 500bp sono state escisse da gel e purificate. I prodotti così ottenuti sono stati sequenziati tramite lo strumento MiSeq (300bp *paired-end*).

### *Data analisi*

I dati grezzi ottenuti con entrambi i protocolli sono stati elaborati al fine ottenere la sequenza dell'intero genoma virale e di investigare la presenza di siti caratterizzati da variabilità (*Single nucleotide variation* - SNV), indice della presenza di sottopopolazioni virali. Gli *adaptor* e le basi caratterizzate da un *quality score* inferiore a 30 sono stati rimossi utilizzando il programma Trimmomatic (<http://www.usadel-lab.org/cms/?page=trimmomatic>). Le *reads* sono state poi allineate ad un genoma di riferimento utilizzando il software Bowtie2 (8). Al fine di discriminare gli SNV genuini da quelli derivati dalla presenza di inevitabili errori generatisi durante la processazione del campione e il sequenziamento stesso, sono stati utilizzati due software open source, (17)ShoRAH {{833 Zagordi,O. 2011}} and QUASR (16), basati su differenti algoritmi. Il primo corregge gli errori di sequenziamento dividendo in cluster tutte le *reads* che si allineano ad una data porzione del genoma. La sequenza consenso di ogni cluster viene quindi assunta essere l'aplotipo originale da cui le restanti, ed erronee, *reads* sono derivate. Il numero di *reads* all'interno del cluster permette altresì di stimare la prevalenza di ciascun aplotipo all'interno della popolazione. Il secondo software sfrutta invece un approccio basato sulla qualità delle sequenze e sul *coverage* di ciascuna posizione per verificare l'accuratezza di ciascuna variante. Al fine di garantire la confidenza dei risultati ottenuti, è stato utilizzato un approccio molto conservativo nell'analisi dei risultati: sono stati accettati solamente le SNV rilevate da entrambi i software e analizzando i dati ottenuti da ambedue i protocolli di sequenziamento. QUASR è stato anche utilizzato per ottenere la sequenza consenso del genoma virale.

## **RISULTATI**

### *Analisi dei dati*

L'analisi delle *reads* ottenute tramite il protocollo 1 e 2 ha permesso di evidenziare un *coverage* medio di 200 e 272. In particolare, ciascuna base è stata sequenziata un numero di volte almeno superiore a 10 nella regione compresa fra il nucleotide 14 e 13427, con il protocollo 1, e da 6 a 13433, con il protocollo 2. L'analisi delle sequenze consenso ha permesso di evidenziare un pieno accordo fra i risultati ottenuti con i 2 metodi di preparazione del campione. Confrontando queste sequenze con quella vaccinale di riferimento (ottenuta con il metodo Sanger) è stata evidenziata una sola differenza in posizione 3566 (T↔C).

### *Analisi delle Single nucleotide variation (SNV)*

Sono stati identificati nove siti nei quali, indipendentemente dal protocollo di sequenziamento utilizzato e dal software di analisi, è stata riscontrata la presenza di sottopopolazioni (Tabella 1). Fra questi, le SNV identificate in posizione 2082, 9571, 12290 e 12978 erano state precedentemente associate al processo di attenuazione vaccinale (4). Confrontando la sequenza del vaccino e del rispettivo progenitore è



stato possibile evidenziare come, invariabilmente, i nucleotidi presenti con la frequenza più alta corrispondano alla sequenza del ceppo vaccinale mentre quelli a frequenza minore coincidano con la sequenza del progenitore (Tabella 2). Similmente, la SNV riscontrata in posizione 6487 ripropone il polimorfismo precedentemente descritto fra la sequenza vaccinale e dei ceppi di origine vaccinale revertiti a virulenza e sequenziati in precedenti studi (4) (Tabella 3). In aggiunta, altri 4 e 2 siti, precedentemente riportati come implicati rispettivamente nei fenomeni di attenuazione e reversione a virulenza sono stati rilevati con almeno un metodo di analisi.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'elevato tasso di mutazione dei virus a RNA (~1 mutazione/genoma/replicazione) caratterizza fortemente la biologia di questi patogeni (9, 14). Queste popolazioni virali sono sovente descritte come uno sciame di progenie mutanti che orbita attorno ad una sequenza consenso. Diversi autori hanno ipotizzato che questa struttura permetta la genesi di molteplici varianti in grado di esplorare rapidamente vaste regioni del *fitness landscape* (1, 6). Sebbene nella stragrande maggioranza dei casi le mutazioni risultino deleterie per il virus (13), in taluni casi queste possono risultare vantaggiose portando alla genesi di "individui" più adatti al presente ambiente o preadattati a nuovi ambienti (9). E' quindi possibile che, all'interno della popolazione di virus vaccinali, siano presenti delle varianti già parzialmente adatte alla replicazione *in vivo* e che queste possano quindi essere progressivamente selezionate in condizioni di campo. In particolare, l'assenza di un'adeguata copertura vaccinale negli allevamenti avicoli può favorire questo fenomeno, permettendo la circolazione del virus vaccinale all'interno dell'allevamento per prolungati periodi di tempo.

I risultati del presente studio hanno permesso di evidenziare l'effettiva presenza di sottopopolazioni virali nel vaccino aMPV sottotipo B studiato. Degno di nota è il riscontro di 4 siti caratterizzati da variabilità genetica precedentemente identificati come responsabili dell'attenuazione del virus vaccinale. Sarebbe stata quindi prevedibile una maggiore *fitness* di questi virus *in vivo* e una conseguente maggiore abilità dei ceppi portatori di queste mutazioni nel replicare e dare sintomatologia. Tuttavia, nessuno di questi siti è stato associato, nei precedenti studi, alla reversione a virulenza, ponendo in dubbio il loro contributo nel determinismo della virulenza.

Non è tuttavia possibile escludere che solo la simultanea presenza di queste mutazioni nel medesimo virus, evenienza attualmente non ricostruibile in modo accurato con gli strumenti di analisi disponibili, ne conferisca la patogenicità. Globalmente, i risultati di questo studio, paiono quindi confermare l'efficacia del processo di attenuazione.

Altre sottopopolazioni, inclusi virus recanti mutazioni in comune con ceppi revertanti, sono state identificate. È ipotizzabile che queste fossero già presenti nel ceppo progenitore e si siano mantenute nel vaccino o, addirittura, siano originate durante la produzione dello stesso. Due siti in particolare hanno presentato la medesima sequenza del ceppo revertante come sottopopolazione (posizione 6487), in un caso, e come popolazione unica (posizione 3566), nell'altro. Un'ipotesi suggestiva è rappresentata dall'idea che questi SNVs costituiscano, potenzialmente interagendo con siti

di attenuazione parziale, il substrato su cui la progressiva selezione ed evoluzione *in vivo* agiscono, sfociando nell'emergenza di ceppi revertanti. Difatti, il limitato numero di SNV identificato, sconfessa fortemente l'ipotesi di una popolazione virulenta già presente "tal quale" nel vaccino. Quanto finora riportato appare in accordo con i risultati di un precedente studio condotto su un vaccino AMPV sottotipo A nel quale è stata riportata l'importanza di sottopopolazioni presenti a bassa frequenza (1 in  $10^6$ ) nel determinare la reversione a virulenza (12). Sebbene, sulla base di queste evidenze, il vaccino in questione sia stato sottoposto a purificazione mediante il metodo delle placche prima dell'immissione in commercio, episodi di reversione a virulenza, sebbene con minor frequenza rispetto alla formulazione non purificata (12), sono stati egualmente identificati (3, 10). Appare quindi impossibile negare il ruolo, quantomeno in termini di co-attore, della progressiva evoluzione virale, in condizioni di campo, nella riacquisizione del fenotipo virulento.

In conclusione, i risultati preliminari riportati nel presente studio, associati a quanto già descritto in letteratura, lasciano intravedere uno scenario caratterizzato dall'azione della pressione selettiva imposta dall'ospite su una popolazione di virus vaccinali di per se non omogenea. Sottopopolazioni parzialmente adattate alla replicazione *in vivo* potrebbero essere preferenzialmente selezionate e costituire la base per la successiva evoluzione nell'ospite e la riacquisizione del fenotipo virulento. Ulteriori studi saranno necessari per valutare la relazione fra la variabilità della popolazione presente nel ceppo progenitore e nel vaccino nonché per analizzare, mediante infezioni sperimentali, l'evoluzione del ceppo vaccinale *in vivo*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Belshaw, R., A. Gardner, A. Rambaut, and O. G. Pybus. (2008). Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. 23:188-193.
2. Catelli, E., M. Cecchinato, M. Delogu, P. de Matteo, G. Ortali, C. Franciosi, M. A. de Marco, and C. J. Naylor. (2004). Avian Pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: A virological, molecular and serological field survey | Infezione da pneumovirus aviare nel tacchino da carne e nel broiler in italia: Indagini di campo mediante tecniche virologiche, sierologiche e molecolari. 3:287.
3. Catelli, E., M. Cecchinato, C. E. Savage, R. C. Jones, and C. J. Naylor. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. Vaccine 24:6476.
4. Cecchinato, M., E. Catelli, C. Lupini, E. Ricchizzi, S. Prosperi, and C. J. Naylor. (2014). Reversion to virulence of a subtype B avian metapneumovirus vaccine: Is it time for regulators to require availability of vaccine progenitors? Vaccine 32:4660-4664.
5. Cecchinato, M., C. Lupini, E. Ricchizzi, M. Falchieri, A. Meini, R. C. Jones, and E. Catelli. (2012). Italian field survey reveals a high diffusion of avian metapneumovirus

- subtype B in layers and weaknesses in the vaccination strategy applied. *Avian Dis.* 56:720-724.
6. Elena, S. F., R. Miralles, J. M. Cuevas, P. E. Turner, and A. Moya. (2000). The two faces of mutation: extinction and adaptation in RNA viruses. *IUBMB Life* 49:5-9.
7. Gough, R. E., and R. C. Jones. (2008). Avian metapneumovirus. In: *Diseases of poultry*, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, N.L. Nolan, and D. E. Swayne. Wiley-Blackwell, Ames, IA.
8. Langmead, B., and S. L. Salzberg. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9:357-359.
9. Lauring, A. S., J. Frydman, and R. Andino. (2013). The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:327-336.
10. Lupini, C., M. Cecchinato, E. Ricchizzi, C. J. Naylor, and E. Catelli. (2011). A turkey rhinotracheitis outbreak caused by the environmental spread of a vaccine-derived avian metapneumovirus. *Avian Pathol.* 40:525-530.
11. Naylor, C., K. Shaw, P. Britton, and D. Cavanagh. (1997). Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathol.* 26:327-338.
12. Naylor, C. J., and R. C. Jones. (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine* 12:1225-1230.
13. Sanjuan, R., A. Moya, and S. F. Elena. (2004). The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:8396-8401.
14. Sanjuan, R., M. R. Nebot, N. Chirico, L. M. Mansky, and R. Belshaw. (2010). Viral mutation rates. *J. Virol.* 84:9733-9748.
15. Van de Zande, S., H. Nauwynck, C. Naylor, and M. Pensaert. (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *Vet. Rec.* 147:132-134.
16. Watson, S. J., M. R. Welkers, D. P. Depledge, E. Coulter, J. M. Breuer, M. D. de Jong, and P. Kellam. (2013). Viral population analysis and minority-variant detection using short read next-generation sequencing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368:20120205.
17. Zagordi, O., A. Bhattacharya, N. Eriksson, and N. Beerenwinkel. (2011). ShoRAH: estimating the genetic diversity of a mixed sample from next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 12:119-2105-12-119.

QUASR							ShoRAH					
Posizione	Protocollo1			Protocollo2			Protocollo1			Protocollo2		
	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage
<b>2082</b>	T	C(12%)	198	T	C(14%)	469	T	C(15%)	100	T	C(16%)	281
<b>4921</b>	A	G(4%)	197	A	G(4%)	246	A	G(7%)	101	A	G(4%)	190
<b>4934</b>	C	T(17%)	197	C	T(4%)	247	C	T(25%)	101	C	T(5%)	186
<b>6346</b>	T	A(10%)	196	T	A(14%)	227	T	A (24%)	101	T	A(16%)	122
<b>6487</b>	T	G(22%)	197	T	G(31%)	427	T	G (38%)	101	T	G(24%)	238
<b>9571</b>	A	T(9%)	194	A	T(11%)	124	A	T(22%)	101	A	T(23%)	71
<b>9610</b>	T	C(7%)	194	T	C(5%)	162	T	C(9%)	101	T	C(14%)	77
<b>12290</b>	A	T(14%)	193	T	A(39%)	166	T	A(68%)	99	T	A(39%)	111
<b>12978</b>	A	G(6%)	197	A	G(38%)	124	A	G(30%)	101	A	G(40%)	73

**Tabella 1.** Siti per i quali tutte le combinazioni di protocolli di sequenziamento e programmi di analisi hanno evidenziato la presenza di SNV. Le posizioni nucleotidiche sono numerate sulla base del genoma di referenza (vaccino VCO3/50) [4]. Per ciascuna di esse sono riportati il *coverage*, il nucleotide di referenza e la corrispondente variante, la cui frequenza è indicata fra parentesi.

QUASR							ShoRAH					
Posizione	Protocollo1			Protocollo2			Protocollo1			Protocollo2		
	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage
1220												
2082	T	C(12%)	198	T	C(14%)	469	T	C(15%)	100	T	C(16%)	281
2422												
2554	T	C (3%)	192									
2654												
3210				T	G (3%)	281						
3391												
5434	G	A (11%)	194				G	A (9%)	101			
5777	T	A (4%)	199				T	A (4%)	101			
6104												
6712												
9571	A	T(9%)	194	A	T(11%)	124	A	T(22%)	101	A	T(23%)	71
9817												
12290	A	T(14%)	193	T	A(39%)	166	T	A(68%)	99	T	A(39%)	111
12978	A	G(6%)	197	A	G(38%)	124	A	G(30%)	101	A	G(40%)	73
13463												
13464												

**Tabella 2.** Siti implicati nel processo di attenuazione [4] identificati come SNV da almeno un metodo di analisi. Le posizioni nucleotidiche sono numerate sulla base del genoma di referenza (vaccino VCO3/50) [4]. Per ciascuna di esse sono riportati il *coverage*, il nucleotide di referenza e la corrispondente variante, la cui frequenza è indicata fra parentesi.

QUASR							ShoRAH					
Posizione	Protocollo1			Protocollo2			Protocollo1			Protocollo2		
	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage	Genoma di Referenza	Variante	Coverage
1461	A	C (1%) T(4%)	190	A	G (1%)	280						
3508	-	-	-									
3566	C	T(100%)	201	C	T(100%)	398	C	T(100%)	101	C	T(100%)	190
4348				A	G (5%)	342						
5614												
6487	T	G(22%)	197	T	G(31%)	427	T	G (38%)	101	T	G(24%)	238
12277												
12847												

**Tabella 3.** Siti implicati nel processo di reversione a virulenza [4] identificati come SNV da almeno un metodo di analisi Le posizioni nucleotidiche sono numerate sulla base del genoma di referenza (vaccino VCO3/50) [4]. Per ciascuna di esse sono riportati il *coverage*, il nucleotide di referenza e la corrispondente variante, la cui frequenza è indicata fra parentesi.

## INFESTAZIONE DA PHTHIRAPTERA NELL'AVIFAUNA ITALIANA

Giacomelli S.\*, Bianchi A.\*, Bertoletti I.\*, Nicastro M.\*\*\*, Ferrari N.\*\*\*, Gallazzi D.\*\*\*, Grilli G.\*\*

\* *Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia, Sez. di Sondrio.*

\*\* *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano.*

### Summary

The present work intend to expose the results of a 9 year long parasitological survey on wild avian fauna.

The main goal is to update the checklist of the Italian fauna for the *Phthiraptera* order with the first signalement of *Myrsidea quadrimaculata* in Italy.

Moreover in this publication we try to explain the differences found in prevalence from species specific and generalist parasites.

In the meta-population studied it seems that generalist lice have a greater chance to colonize a single species. Some example are presented as a validation of this theory (*Streptopelia decaocto* and *Parus major*) and the example of *Turdus merula* as a exception to this paradigm.

Lastly we show the poor parasitological situation of *Erithacus rubecula* in Italy.

### INTRODUZIONE

Tra gli ectoparassiti gli *Phthiraptera* sono quelli che dimostrano il grado di ospite-specificità superiore (13).

Sono insetti privi di ali, parassiti obbligati che completano tutto il loro ciclo vitale sul corpo di un organismo ospite dove si nutrono principalmente di frammenti di penne, epidermide desquamata, sangue o secreti (8).

L'infestazione avviene in maniera opportunistica soprattutto quando gli ospiti sono in stretto contatto, come ad esempio durante l'accoppiamento.

I primi lavori scientifici riguardanti lo studio degli *Phthiraptera* in Italia risalgono al 1882 con gli elenchi ed i cataloghi di Simonetta (19), Picaglia (16, 17) e Berlese (1, 2) successivamente dalla metà del secolo scorso i lavori di Conci (4, 5, 6), Manilla e colleghi (12, 13, 14) arrivarono a definire 267 specie di *Phthiraptera* rinvenuti su fauna italiana.

Recentemente, il gruppo di autori scrivente, ha ripreso lo studio di questi ectoparassiti aggiornando ulteriormente la lista e portando il numero di specie a 273 (9).

La presente pubblicazione intende analizzare i dati raccolti su questi parassiti in 9 anni di studio, segnalando inoltre una specie nuova per la fauna italiana aggiornando quindi il numero di *Phthiraptera* sul territorio nazionale a 274.

### MATERIALI E METODI

Il campionamento è stato effettuato presso:

- Stazione di inanellamento I.S.P.R.A., Alpe Americano (VA);
- Stazione di inanellamento I.S.P.R.A., Alpe Rosello (BS);



- Stazione di inanellamento I.S.P.R.A., Arcisate (VA);
- Stazione di inanellamento I.S.P.R.A., Trebbiano (VA);
- Stazione di inanellamento I.S.P.R.A., Lambrone - Lago di Pusiano (CO);
- CRAS ed Oasi WWF “Bosco di Vanzago”, (MI);
- CRAS Uomo e Territorio Pro Natura, centro faunistico Parco dell’Adamello (BS),
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna, sezione di Sondrio (SO)

Sono stati analizzati 542 uccelli, appartenenti a 49 specie diverse, nel periodo di studio 2006- 2014.

Per la raccolta dei parassiti, nel caso delle stazioni di inanellamento, si è approfittato del tempo intercorrente tra la cattura tramite rete e la manipolazione per misurazione e marcatura del soggetto nebulizzando spray antiparassitario a base di piretroidi con tecnica standardizzata e ripetuta, evitando inutili stress e danni per il soggetto. La stessa metodica è stata adottata sui soggetti in cura presso i CRAS e sulle carcasse conferite alla sezione di Sondrio dell’IZSLER.

dopo una rapida identificazione a livello di ordine tassonomico tramite lente di ingrandimento gli ectozoi sono stati conservati in etanolo 70%

L’ulteriore identificazione di genere e specie secondo le definizioni di Lyal (11) è stata effettuata con stereomicroscopio tramite opportune chiavi dicotomiche (3, 18).

La checklist di riferimento per gli *Phthiraptera* presenti in Italia, in Europa e nel mondo sono state reperite tramite appositi database online (7, 9, 12, 18).

I dati raccolti sono stati correlati alla numerosità teorica di ogni singola specie definita dal rapporto 2008 su distribuzione, abbondanza e stato di conservazione (21).

## RISULTATI

La prevalenza di animali infestati da *Phthiraptera* è risultata essere del 11% (62/542) con prevalenze dallo 0% al 100% a seconda della specie ospite considerata. Sono state campionate 27 specie diverse di *Phthiraptera* di cui 15 appartenenti al subordine *Amblycera* (14 famiglia *Menoponidae*, 1 famiglia *Ricinidae*) e 12 appartenenti al subordine *Ischnocera* famiglia *Philopteridae*.

## DISCUSSIONE

È interessante notare come, esaminando la singola specie ospite, la prevalenza dell’infestazione sia maggiore per le specie di *Phthiraptera* più generaliste, dotate quindi una più ampia popolazione potenzialmente infestabile (tabelle da 1 a 2). Pare infatti che il parassita tragga vantaggio dalla possibilità di infestare specie diverse presenti sullo stesso territorio. Pur essendo i contatti diretti la principale via di contagio (ma piuttosto rari tra specie diverse di uccelli) altre vie, come la condivisione di nidi o di bagni di sabbia, (8, 20) parrebbero avere un ruolo essenziale nel maggior successo delle specie generaliste. Analizzando i casi specifici di *Streptopelia decaocto* possiamo notare come, essendo una specie presente in Italia soltanto dalla metà del secolo scorso, ci sia una maggiore prevalenza di quei parassiti appunto condivisi con l’ospite presente in Italia da più tempo (*Streptopelia turtur*) risultano invece molto più rari i parassiti tipici della specie nel suo areale di origine. Situazione simile per la cinciallegra (*Parus major*) che presenta infestazione soltanto

da parassiti condivisi con altre specie del genere *Parus*, peraltro non segnalato nella bibliografia fino al 2012 (Giacomelli et al) pur essendo la specie autoctona.

I parassiti presenti sul merlo (*Turdus merula*) manifestano invece un andamento, per certi versi, controcorrente (tab. 3). *Brueelia jacobii* e *Brueelia merulensis*, pur essendo strettamente specie specifici, hanno una prevalenza maggiore rispetto a tre specie condivise con altri turdidi, due delle quali non sono nemmeno state riscontrate in questo studio pur essendo segnalate in bibliografia.

*Menacanthus eurysternus* è il parassita più generalista e, anche sul merlo, più frequentemente riscontrato.

Altro caso particolare è quello del pettirosso (*Erithacus rubecola*). Da questa specie infatti non è stato possibile raccogliere alcun ectoparassita appartenente all'ordine *Phthiraptera* e, seppur *Ricinus rubeculae* abbia a disposizione potenzialmente un notevole numero di soggetti infestabili, non ne esistono nemmeno segnalazioni in bibliografia (tab. 4).

Infine si segnala, per la prima volta in Italia, la presenza di *Myrsidea quadrimaculata* su 9 esemplari di *Loxia curvirostra*.

Di seguito la denominazione nel formato utilizzato per la checklist mondiale degli *Phthiraptera* (18).

*Myrsidea quadrimaculata* CARRIKER, M.A., JR., 1902

*Loxia curvirostra* (LINNAEUS, 1758) [ringing station, Alpe Rosello BS Italy, 2012.09.18., Giacomelli Stefano]

<i>Streptopelia decaocto</i> n. 10							
Specie	Ospite-Tipo	Individuate in questo studio	Individuate in Manilla 2003	Spettro d'ospite	Altri ospiti presenti in Italia	p	Tot popolazione ospite stimata in Lombardia
<i>Bonomiella concii</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	no	no	1 specie		0%	73000
<i>Coloceras hilli</i>	<i>Streptopelia semitorquata</i>	no	no	6 specie, 1 genere		0%	73000
<i>Turturicola salimalii</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	no	no	2 specie, 1 genere		0%	73000
<i>Hohorstiella modesta</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	si	no	1 specie		10%	73000
<i>Coloceras piageti</i>	<i>Streptopelia chinensis</i> , <i>Streptopelia bitorquata</i>	si	no	3 specie, 1 genere		20%	73000
<i>Columbicola bacillus</i>	<i>Streptopelia turtur</i>	si	no	8 specie, 1 genere	<i>Streptopelia turtur</i>	100%	95000
Prevalenza totale						100%	

**Tabella 1: specie di *Phthiraptera* segnalate per l'ospite *Streptopelia decaocto*, p= prevalenza**

<i>Parus major</i> n. 14							
Specie	Ospite-Tipo	Individuate in questo studio	Individuate in Manilla 2003	Spettro d'ospite	Altri ospiti presenti in Italia	p	Tot popolazione ospite stimata in Lombardia
<i>Brueelia weberi</i>	<i>Parus major</i>	no	no	1 specie		0%	74000
<i>Philopterus thuringiacus</i>	<i>Parus major</i>	no	no	1 specie		0%	74000
<i>Sturnidoecus hudeci</i>	<i>Parus major</i>	no	no	1 specie		0%	74000
<i>Philopterus pallascens</i>	<i>Parus major, Parus palustris</i>	no	no	2 specie 1 genere	<i>Parus palustris</i>	0%	89200
<i>Menacanthus sinuatus</i>	<i>Parus major</i>	si	no	8 specie 1 genere	<i>Parus ater, Parus caeruleus, Parus palustris</i>	7%	217200
Prevalenza totale						7%	

**Tabella 2: specie di *Phthiraptera* segnalate per l'ospite *Parus major*, p= prevalenza**

<i>Turdus merula</i> n. 69							
Specie	Ospite-Tipo	Individuate in questo studio	Individuate in Manilla 2003	Spettro d'ospite	Altri ospiti presenti in Italia	P	Tot popolazione ospite stimata in Lombardia
<i>Brueelia amsel</i>	<i>Turdus merula</i>	no	si	1 specie		0%	71500
<i>Brueelia jacobi</i>	<i>Turdus merula</i>	si	no	1 specie		3%	71500
<i>Brueelia merulensis</i>	<i>Turdus merula</i>	si	si	1 specie		3%	71500
<i>Myrsidea thoracica</i>	<i>Turdus viscivorus</i>	no	si	9 specie, 2 generi	<i>Turdus viscivorus</i>	0%	73000
<i>Philoaterus turdi</i>	<i>Turdus philomelos</i>	no	si ( <i>Philoaterus merulae</i> )	2 specie, 1 genere	<i>Turdus philomelos</i>	0%	83700
<i>Ricinus elongatus</i>	<i>Turdus viscivorus</i>	si	si	11 specie, 4 genera	7 specie, 4 genera	1%	305950
<i>Menacanthus eurysternus</i>	<i>Pica pica</i>	si (da 4 specie, 3 genera)	si	176 specie, 100 genera	20 specie, 15 genera	4%	520750
Prevalenza totale						9%	

**Tabella 3: specie di *Phthiraptera* segnalate per l'ospite *Turdus merula*, p= prevalenza**

<i>Erithacus rubecula</i> n. 83							
Specie	Ospite-Tipo	Individuate in questo studio	Individuate in Manilla 2003	Spettro d'ospite	Specie presenti in Italia	p	Tot popolazione ospite stimata in Lombardia (vigorita & Cucè 2008)
<i>Brueelia tristis</i>	<i>Erithacus rubecula</i>	no	no	1 specie		0%	42500
<i>Philopterus rubeculae</i>	<i>Erithacus rubecula</i>	no	no	1 specie		0%	42500
<i>Ricinus rubeculae</i>	<i>Erithacus rubecula</i>	no	no	14 specie, 12 genera	<i>Luscinia svecica</i> , <i>Monticola solitarius</i> , <i>Phoenicurus ochruros</i> , <i>Phoenicurus phoenicurus</i> , <i>Prunella modularis</i> ,	0%	111250
Prevalenza totale						0%	

**Tabella 4: specie di *Phthiraptera* segnalate per l'ospite *Erithacus rubecula*, p= prevalenza**

## CONCLUSIONI

L'andamento del contagio in base alla densità di popolazione assume sfaccettature particolari quando si prendono in considerazione popolazioni di specie diverse con contatti piuttosto scarsi e parassiti con particolari esigenze trofiche e biologiche. Ciononostante spesso la somma delle popolazioni sensibili riflette la prevalenza riscontrata sulla singola specie. Ne è la dimostrazione il caso della tortora dal collare sulla quale il riscontro dei parassiti più tipici è andato a scapito di un parassita con spettro d'ospite più adatto alle popolazioni italiane.

In casi particolari come quello del merlo i fattori che portano ad un discostamento da questa situazione potrebbero essere ricercati in un possibile cambio del comportamento migratorio di questa specie o di quelle con cui condivide i parassiti. Fattore questo ancora più verosimile se si considera l'assenza attuale proprio di quei parassiti condivisi segnalati in passato.

Nel pettirosso è possibile stimare una prevalenza totale di infestazione inferiore al 4,25% in Lombardia dato il numero campionario di 83 individui. Stimando una prevalenza dell'1 % sarebbe possibile, con un livello di confidenza del 95%, riscontrare almeno una positività con una dimensione campionaria di 298 capi.

Dato il buon numero di soggetti raccolti raggiunto in questo studio limitando lo sforzo di campionamento ad attività volontaria in ambito non specifico, si può affermare il valore di screening generale sulla popolazione di avifauna lombarda.

Concentrandosi in futuro sulle singole specie che non hanno dimostrato corrispondenza tra maggior popolazione infestabile e maggior prevalenza si potrebbe avvalorare l'utilizzo del meccanismo ospite-parassita nello studio della biologia e gestione degli uccelli selvatici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Berlese A. (1894). Materiali per un catalogo dei Mallofagi e Pediculini italiani. I. Bull. Soc. Ent. It. 26: 51-65.
2. Berlese A. (1895). Materiali per un catalogo dei Mallofagi e Pediculini italiani. II. Bull. Soc. Ent. It. 27: 232-244.
3. Clay T, Hopkins GHE. (1950). The early literature on mallophaga. Bull. British Museum. London 1-362.
4. Conci C. (1940) a. Note sui Mallofagi italiani. I. Boll. Soc. Ent. It. 72: 71-81.
5. Conci C. (1940) b. Note sui Mallofagi italiani. II. Una nuova varietà di Stachiella retusa Nitzsch. Boll. Soc. Ent. It., 72: 116-118.
6. Conci C. (1940) c. Note sui Mallofagi italiani. III. Mallofagi del Museo di Storia Naturale della Venezia Tridentina. Studi Trentini Sc. Nat., 21: 191-193.
7. De Jong, Y.S.D.M. (ed.) (2013) Fauna Europaea version 2.6. Web Service available online at <http://www.faunaeur.org>
8. Fey, A. J.; Oliver, D. L.; Williams, M. B. (1997). Theft of nest material involving honeyeaters (Meliphagidae). Corella 21:119-123
9. Giacomelli S., Gallazzi D., Grilli G., Pozzi M., Scebba S., Soprano M., Vas Z. (2013). Nuove specie di mallofagi (Insecta: Phthiraptera) per l'avifauna italiana. Atti della Società italiana di patologia aviare. - ISSN 1972-9782. - 52, pp. 182-183.



10. Johnson KP, Clayton DH. (2003). The biology, ecology, and evolution of chewing lice. Pp. 449-476. In: Price, R. D., Hellenthal, R. A., Palma, R. L., Johnson, K. P., Clayton, D. H. (eds). The chewing lice, world checklist and biological overview. - Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
11. Lyal, C.H.C., 1985. Phylogeny and classification of the Psocodea, with particular reference to the lice (Psocodea: Phthiraptera). Syst. Entomol. 10, 145-165
12. Manilla G. (2003) checklist of the Italian fauna on-line version, Checklist: Copyright © 2000 by the Italian Ministry of Environment, Website: Copyright © 2003 by Fabio Stoch. All Rights Reserved. Fascicolo 39, Phthiraptera.
13. Manilla G, Cicolani B. (1983). Mallofagi rinvenuti su uccelli in Abruzzo. Riv. Parassitol., 44: 217-232.
14. Martin-Mateo M, Manilla G. (1988). Nuevos Malofagos de Aves en Italia. Riv. Parassitol., 49: 141-150.
15. Marshall AG. (1981). The Ecology of Ectoparasitic Insects. Academic Press, London, UK.
16. Picaglia L. (1885) a. Pediculini nuovi del Museo di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Modena. Atti Soc. It. Sc. Nat., 28: 82-90.
17. Picaglia L. (1885) b. Pediculini dell'Istituto Anatomico Zoologico della R. Università di Modena. Atti Soc. Naturalisti Modena, 4: 97-162.
18. Price, R. D., Hellenthal, R. A., Palma, R. L. 2003. World checklist of chewing lice with host associations and keys to families and genera. Pp. 1-448. In: Price, R. D., Hellenthal, R. A., Palma, R. L., Johnson, K. P., Clayton, D. H. (eds). The chewing lice, world checklist and biological overview. - Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
19. Simonetta L. (1882). Elenco sistematico dei Pediculini appartenenti al Museo Zoologico della R. Università di Pavia. Boll. Soc. Ent. It.,
20. Timm, R. M. (1983). Fahrenheit's rule and resource tracking: a study of host-parasite coevolution
21. Vigorita V, Cucè L. (2008). La fauna selvatica in Lombardia. Rapporto 2008 su distribuzione, abbondanza e stato di conservazione di uccelli e mammiferi. Regione Lombardia.

# **VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA AVIFAUNA STANZIALE E MIGRATORIA CATTURATA PRESSO L'ISOLA DELL'ASINARA.**

Grilli G., Zullo F., Ferrazzi V., Gallazzi D.

*Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET), Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, guido.grilli@unimi.it*

## **Summary**

Evaluation of the sensitivity to antibiotics of *Escherichia coli* strains isolated from local and migratory birds captured on the Island of Asinara.

The phenomenon of antimicrobial resistance in bacteria has long been known. Numerous studies have investigated this issue in humans and farm animals, while it is not yet clear how this manifests itself in wildlife. The purpose of our work was to monitor the antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from local and migratory birds captured on the Island of Asinara, a national park since 1991. This place was chosen because of the particular location of the island and the fact that there are no permanent human settlements or herds of animals. In total, in a ringing season, we captured 170 subjects belonging to 21 species of which 13 were migratory and 8 sedentary, for a total of 49 isolated strains of *E. coli*. These strains showed a resistance > 50% to quinolones, polymyxins, and tetracycline, 30% to sulfonamides, and less than 5% to fluoroquinolones and other classes of antibiotics. Strains resistant to third and fourth generation cephalosporins and to carbapenems are also noteworthy. Further investigation is needed to study the role of birds, especially migratory, in more detail in order to better understand the role they may have as a possible reservoir and diffuser of antimicrobial resistant strains.

## **INTRODUZIONE**

L'antibiotico resistenza di batteri patogeni e commensali di origine animale è uno dei più grandi problemi di sanità pubblica in tutto il mondo. Questa considerazione è così importante che l'Unione Europea, nell'emanare le varie direttive, ha considerato l'antibiotico resistenza una "zoonosi trasversale" così come espresso dalla Direttiva 2003/99/CE del 17 novembre 2003. In tale Direttiva, l'articolo 16 cita: "Si rende necessario sorvegliare la preoccupante insorgenza di casi di resistenza agli antibiotici (quali medicinali antimicrobici e additivi antimicrobici nei mangimi). Si dovrebbe disporre che la sorveglianza non riguardi soltanto agenti zoonotici ma anche, nella misura in cui presentano una minaccia per la sanità pubblica, altri agenti. Potrebbe rivelarsi opportuna in particolare la sorveglianza di organismi indicatori, i quali costituiscono una riserva di geni di resistenza che possono trasferire ai batteri patogeni." Sono numerosi gli studi che hanno indagato su tale argomento, nell'uomo e negli animali d'allevamento, mentre non è

ancora chiara come questa si manifesti negli animali selvatici. Infatti, nel caso della fauna selvatica, lo studio dell'antibiotico-resistenza non viene affrontato per stabilire migliori strategie di cura, bensì per valutare se ci sono tali caratteristiche e in quale entità. In particolar modo gli uccelli sono degli ottimi indicatori ambientali in quanto possono, nel loro migrare, acquisire batteri resistenti e distribuirli a seguito di contatto con attività antropiche e di allevamento. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di monitorare l'antibiotico resistenza di ceppi di *Escherichia coli* isolati da avifauna stanziale e migratoria catturata presso l'Isola dell'Asinara, parco nazionale dal 1991. La scelta di questo luogo è data dalla particolare ubicazione dell'isola e dal fatto che non esistano stabili insediamenti umani né allevamenti di animali.

## **MATERIALI E METODI**

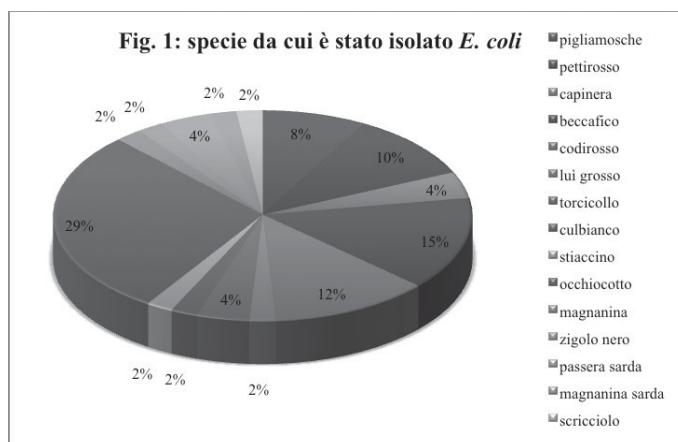
Il nostro lavoro si è svolto presso il Parco Nazionale dell'Asinara in Sardegna, durante l'attività di inanellamento scientifico autunnale che corrisponde ai mesi di settembre e ottobre. La cattura degli uccelli è avvenuta mediante l'uso di 8 reti Mist Nets, il controllo di tali reti veniva fatto ogni ora dalle 7 del mattino fino alle 22 di sera. Una volta prelevati gli uccelli imbrigliati nelle reti, questi venivano inseriti in appositi sacchetti di cotone e portati alla stazione di inanellamento dove ogni individuo veniva identificato per specie, sesso, età e ne venivano segnalati i dati biometrici. In ogni sacchetto di cotone, lavato e disinfettato, utilizzato per trasportare gli uccelli dalle reti alla stazione di inanellamento, era stato inserito un disco di carta da filtro in cui i soggetti potevano defecare e quindi si procedeva a ritagliare la parte imbrattata che veniva inserita in provetta e immediatamente refrigerata a temperatura di 4°C. I campioni sono stati poi trasportati presso il DIVET dove sono stati processati per la ricerca di enterobatteri al fine di isolare *Escherichia coli* e di valutarne quindi l'antibiotico resistenza. Il campione veniva immerso in Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Oxoid) e incubato per qualche ora a 37°C; successivamente il campione veniva seminato su terreno solido Chromogenic Urinary Tract Infection (UTI) (Oxoid) incubato a 37°C per 24 ore in aerobiosi. Le colonie che avevano un aspetto ascrivibile ad *E. coli* sono poi state ritrapiantate su TSA Agar e identificate con micrometodo RapID ONE System (Oxoid). I ceppi di *E. coli* così identificati sono stati sottoposti al test di sensibilità agli antimicrobici utilizzando la tecnica di Kirby-Bauer e confrontando i risultati ottenuti con gli standard di riferimento (EUCAST 2013) suddividendoli in resistenti, intermedi e sensibili. Gli antimicrobici testati sono stati i seguenti: Amoxicillina (AMX), Cefotaxime (CTX), Nalidixico (NA), Flumequina (UB), Ciprofloxacina (CIP), Enrofloxacin (ENR), Levofloxacina (LEV), Norfloxacina (NOR), Aminodisina (AM), Apramicina (APR), Gentamicina (CN), Neomicina (N), Streptomycin (S), Cloramfenicolo (C), Florfenicolo (FFC), Trimethoprim/sulfametossazolo (SXT), Trisulfamidico (S3), Doxiciclina (DO), Ossitetraciclina (OT), Colistina (CT), Polimixina B (PB), Lincom/spectinomycin (LS), Imipemen (IPM).

## **RISULTATI**

Nell'arco di due settimane, sono stati raccolti 170 campioni di feci da diverse specie di uccelli, 58 da specie stanziali e 112 da specie migratorie.

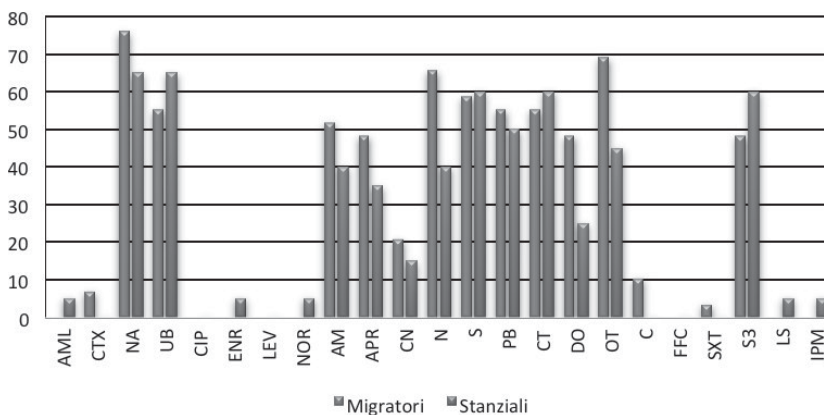
SPECIE	STANZIALE	MIGRATORIA	NUMERO CAMPIONI
Occhiocotto	x		46
Codirosso		x	26
Beccafico		x	25
Pettiroso		x	22
Capinera		x	16
Pigliamosche		x	7
Lui grosso		x	4
Passera sarda	x		3
Torricollo		x	3
Saltimpalo	x		2
Zigolo Nero	x		2
Balia nera		x	2
Magnanina	x		2
Stiaccino		x	2
Cannaiola		x	2
Tordo bottaccio		x	1
Tottavilla	x		1
Sterpazzola		x	1
Magnanina Sarda	x		1
Culbianco		x	1
Scricciolo	x		1
TOTALE	8	13	170

Da questi campioni sono isolati 49 ceppi di *E. coli*; di questi il 59% provenivano da specie migratrici e il restante 41% da specie stanziali (Fig. 1)



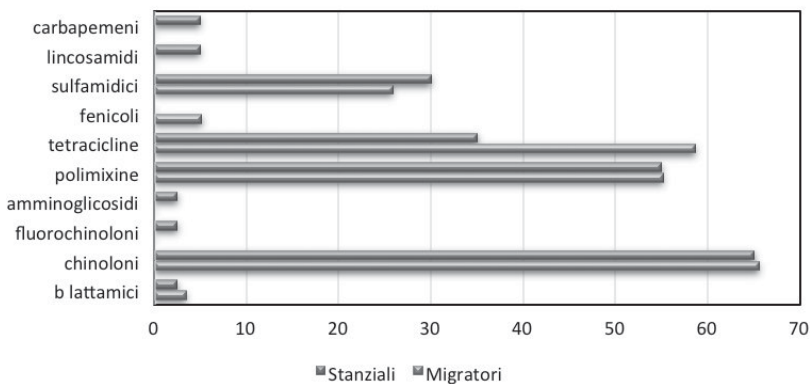
Tutti i 49 ceppi isolati sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità agli antibiotici, i risultati relativi alla resistenza, suddivisi tra gli isolati da specie migratrici e stanziali, sono riportati in Fig. 2

**Fig. 2: antibiotico resistenza di *E. coli*: confronto tra specie migratrici e stanziali**



Raggruppando i principi attivi all'interno delle famiglie chimiche, la media delle resistenze è riportata graficamente nella Fig. 3.

**Fig. 3: Resistenze medie alle varie classi di antimicrobico**



Si può notare come la resistenza registrata risulta essere elevata soprattutto nei riguardi della classe dei chinoloni, delle polimixine e delle tetracicline, per i sulfamidici la resistenza si attesta sul 30% dei ceppi mentre risulta inferiore al 5% nelle altre classi di antimicrobici. Si segnala comunque la presenza di alcuni ceppi resistenti a carbapemeni e a cefalosporine di terza generazione.

## DISCUSSIONE

La scelta di monitorare l'antibiotico resistenza è scaturita dall'allarmante continuo diffondersi della resistenza agli antibiotici, fenomeno di continua crescita, non solo in ospedali, ma anche in zone urbane e in ambienti totalmente naturali (Guerra *et al.*, 2014). Questo fenomeno in animali da reddito (bovini, pollame, conigli, ovini e caprini) è in parte spiegata con la storia pregressa dell'utilizzo continuo degli antimicrobici in terapia ed è probabilmente questo ad averne influenzato la presenza anche in animali selvatici venuti a contatto con tali realtà (Selfi *et al.*, 2012). Oltre agli animali da reddito, diversi Autori hanno indagato sulla presenza di antibiotico resistenza in batteri fecali, specialmente *E. coli*, isolati da specie di mammiferi selvatici, spesso catturati nelle vicinanze di allevamenti o zone urbane (Guenther *et al.*, 2012) o corsi d'acqua (Servais e Passerat, 2009), dimostrando che le specie selvatiche, una volta acquisiti ceppi resistenti, hanno un ruolo importante anche nella loro diffusione nell'ambiente (Gilliver *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2008; Carattoli, 2008). Negli ultimi anni si riscontra un maggiore interesse inerente gli animali selvatici per capire meglio sia l'origine dell'antibiotico resistenza registrata nella fauna sia la sua diffusione inter e intraspecifica. A tale riguardo si ricorda che tale fenomeno è stato ritrovato anche in zone assolutamente remote e ben lontane da qualsiasi tipo di contatto umano (Smith *et al.*, 2014). L'avifauna migratoria, grazie alla sua maggiore mobilità, ha più probabilità di avere contatti con ceppi resistenti agli antibiotici presenti negli ambienti in cui vivono animali domestici (pascoli o stalle) o dove vi è maggiore contaminazione fecale, anche umana (distribuzione di liquami o letame). Vi è la possibilità che, una volta acquisiti questi ceppi, le specie migratrici facciano da vettore nei vari ambienti di sosta contaminandoli. Potrebbe essere quindi, che i risultati da noi ottenuti siano dovuti al contatto tra uccelli migratori e stanziali presso l'isola dell'Asinara, non sembra infatti esserci differenza tra ceppi isolati da specie stanziali e migratorie. In questo contesto è da tener presente che non vi è insediamento umano né allevamenti, per cui è molto bassa la possibilità che si verifichino contatti tra la fauna del luogo e animali domestici, il ritrovamento però di alcuni ceppi resistenti alle cefalosporine e ai carbapemeni fa pensare di più a ceppi di origine umana. Anche Santos *et al.*, recentemente (2013), hanno svolto degli studi in realtà del tutto isolate sia da centri urbani che da allevamenti, come nel caso dell'arcipelago delle Azzorre. Anche una ricerca eseguita sugli uccelli artici ha dimostrato la presenza di batteri multi resistenti agli antibiotici, indicando come la migrazione sia in parte responsabile del trasferimento dell'antibiotico resistenza in aree remote e lontane da centri urbani (Benskin *et al.*, 2009)

## CONCLUSIONI

La causa della resistenza agli antibiotici risiede in molteplici attività antropiche oltre che essere legata a specifiche caratteristiche intrinseche di alcune specie batteriche. Con il nostro lavoro, malgrado il limite del campionamento, ho potuto constatare come l'avifauna, sia migratoria che stanziale, possa ospitare ceppi antibiotico resistenti e fungere

effettivamente da diffusore come sostengono Santos *et al.*, (2013).

L'uso dell'antibiotico per la società odierna è essenziale per il trattamento di malattie infettive e non è possibile farne a meno, ma sarebbe sicuramente utile uno studio più approfondito e non saltuario dei serbatoi ambientali di resistenza (Radhouani *et al.*, 2013). Non è sufficiente tamponare il problema, minimizzandone l'entità, ma è necessario combatterne la causa: in base ai risultati emersi anche dalle nostre osservazioni, si può affermare che l'interazione animale domestico-selvatico-uomo è il punto focale su cui concentrare le indagini e il monitoraggio di tale fenomeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Benskin C., Wilson K., Hartley I., Harley K. (2009) Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection". Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol. Rev.*, 84: 349–373,
2. Carattoli A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microbiol Infect*, 14: 117–23,
3. Costa D, Poeta P, Saenz Y, Vinue L, Coelho AC, Matos M. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microb Drug Resist*, 14:71–7,
4. Gilliver M.A., Bennett M, Begon M, Hazel SM, Hart CA. (1999). Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*; 401:233–4,
5. Guenther S., Bethe A., Fruth A., Semmler T., Ulrich R.G. (2012). Frequent Combination of Antimicrobial Multiresistance and Extraintestinal Pathogenicity in *Escherichia coli* Isolates from Urban Rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *PLoS ONE* 7(11) 29:1902–1908,
6. Guerra B., Fischer J., Helmuth R. (2014). An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology*, 171: 290–297.
7. Radhouani H., Igrejas G., Gonçalves A., Pacheco R., Monteiro R., Sargo R., Brito F., Torres f C., Poeta P. (2013). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and Enterococci from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Anaerobe*, 23 : 82-86
8. Santos T., Silva N., Igrejas G., Rodrigues P., Micael J., Rodrigues T., Resendes R., Gonçalves A., Marinho C. , Gonçalves D., Cunha R., Poeta P. (2013) Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe* 24: 25-31,
9. Seifi. S, Shirzard, M. R. (2013). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from free range poultry or wild birds at the southern Caspian Sea coast of Iran. *Web of Science*, 64: 249-254,
10. Servais P., Passerat J.: (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment* 408 365–372
11. Smith S., Wang J., Funning S., McMahon B. J. (2014). Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: a coincidence or cause for concern?. *Irish Veterinary Journal*, 67:8.



## CONTROLLO INTEGRATO DI *DERMANYSSUS GALLINAE* CON ELEVATE TEMPERATURE ALL'INTERNO DI ALLEVAMENTI AVICOLI

*Dermanyssus gallinae* integrated control with high temperature treatment in poultry farm

Paolo Guerra (\*) Paolo Radeghieri (\*\*)

(\*) HPC OSD Gruppo Ecotech Srl di Campogalliano (MO), e mail: paolo.guerra@osdgroup.it, paolo.guerra@nopest.it

(\*\*)Dipartimento di Scienze Agrarie, Area di Entomologia, *Alma Mater Studiorum* di Bologna

Viale Fanin, 42 Bologna, email: Paolo.radeghieri@unibo.it

### Summary

After methyl bromide ban in 2007, in Italy and Europe heating is used extensively to control stored-product insect and mite pest. A treatment with high temperature occurred on December 2014 in a empty 8.400 m<sup>3</sup> poultry farm for *Dermanyssus gallinae* control. After warehouse cleaning 400 adults of *D. gallinae*, and 400 pupae of *Calliphora* spp. were introduced inside glass probe for control the treatment efficacy. *D. gallinae* mortality reached 100% at exposure of 24,36, 48 hours and 99,75% at 18 hours. Control mortality outside the poultry farm was 30% for mites and 10% for *Calliphora* spp. pupae.

### 1. Introduzione e scopo dell'esperimento

Erroneamente noto come “pidocchio rosso” - per pidocchio ci si riferisce invece ad un insetto - il *Dermanyssus gallinae* (De Geer) (Mesostigmata: Dermanyssidae) è un acaro. Rappresenta uno dei più pericolosi ectoparassiti degli allevamenti avicoli [Fig.1]; la sua presenza massiccia, soprattutto a carico delle galline ovaiole arreca ogni anno pesanti ricadute sulla produttività degli animali. Diffuso in tutto il mondo, è riconosciuto il



Fig. 1

suo ruolo probabile di vettore di diversi patogeni virali e batterici (Sparangano *et al.*, 2014). In condizioni ottimali compie l'intero ciclo vitale in una settimana. L'acaro si nutre del sangue dei volatili sia nelle forme giovanili, che da adulto, in quanto la femmina necessita di proteine per fare maturare le proprie uova (Chauve, 1998). *D. gallinae* passa la maggior parte della sua esistenza nascosto in vari pertugi presenti nell'allevamento e solo durante le ore notturne si muove alla ricerca dell'ospite su cui nutrirsi e sul quale non dimora a differenza di altri acari oritofili come *Ornithonyssus sylviarum* (Canestrini e Fanzago) che completano il loro ciclo vitale sull'animale di cui si nutrono. Le ovaiole attaccate manifestano insofferenza, irritabilità, diminuzione della produttività e in casi estremi, con pullulazioni massicce dell'acaro, dall'anemia fino alla morte. Nonostante lo svuotamento degli allevamenti e le operazioni di pulizia e di disinfestazione con acaricidi, l'acaro e le stesse uova possono annidarsi ugualmente negli anfratti dei capannoni e nelle pertinenze manifestandosi in modo massiccio non appena vengono introdotte le galline ovaiole. Per una efficace azione contro gli stadi vitali degli infestanti, all'interno di un allevamento è stato effettuato un trattamento con le elevate temperature con il duplice scopo di determinare la valenza di questo metodo contro *D. gallinae* e per esaminare l'applicabilità del sistema nell'ambito degli allevamenti. Il metodo delle elevate temperature, quale alternativa all'impiego dei gas tossici è utilizzato in Italia da diversi anni nel settore alimentare (Guerra, 2009) ed è oggi considerato un valido sistema per la disinfestazione, anche ovidica, applicabile nei pastifici (Guerra *et al.* 2012) e nei molini (Guerra, 2013).

## **2. Cenni biologici di *Dermanyssus gallinae* ed effetti della temperatura sul suo ciclo vitale.**

La femmina misura circa 1 mm di lunghezza e può apparire grigia oppure rossastra dopo il pasto di sangue. Dopo avere effettuato il pasto di sangue, che non dura più di 60-90', depone durante la sua esistenza fino a 35 uova nelle vicinanze degli ospiti. Esse si presentano di forma ovale biancastre (0.4 mm). Le forme giovanili sgusciano – a 28-30 °C - dopo circa 2-3 giorni di incubazione. Le larve non si nutrono, e sono caratterizzate dall'aver 6 zampe, ma dopo avere svolto la prima muta e divenute ninfe di prima età con 8 zampe (protoninfa) cominciano a ricercare il pasto di sangue. Dopo una successiva muta, ninfa di seconda età, l'acaro raggiunge la forma adulta con una terza muta. In situazioni ottimali (27-28 °C) l'intero ciclo – da uovo a uovo – può concludersi in 7 giorni. Da prove effettuate da ricercatori nord europei (Nordenfors *et al.*, 1999; Maurer e Baumgartner, 1992; Rust e Reiersen, 1997) è risultato che le temperature che permettono la ovideposizione possono variare dai 5 ai 45°C con l'optimum sui 20°C con il 70% U.R. Le femmine ovidepongono per la durata di 1-3 giorni dai 20 ai 45°C ma la durata dell'ovideposizione può dilatarsi a 28 giorni se la temperatura cala sui 5°C. Le uova sono suscettibili alla disidratazione. Gli adulti possono sopravvivere anche 9 mesi senza pasto di sangue se le temperature si mantengono dai 5 ai 25°C ad umidità che possono variare tra 60-80% UR. Gli artropodi non sono in grado come i mammiferi di mettere in atto una termoregolazione del loro organismo e quindi sono più sensibili alle temperature estreme. Nel caso di *D. gallinae*, temperature maggiori di 45°C e minori di -20°C sono letali per ogni stadio di sviluppo anche per esposizioni di breve durata (Nordenfors *et al.*, 1999; Tucci *et al.*, 2008). Ma non è escluso che lenti adattamenti possano essere registrati come altri autori hanno evidenziato (Kirkwood, 1963).

Anche nel caso di *O. sylviarum* è stato dimostrato che una esposizione continuativa a  $-20^{\circ}\text{C}$  o maggiore di  $49^{\circ}\text{C}$  per sole 2 ore uccide l'acaro (De Vaney, 1986). Il valore dell'umidità relativa dell'aria può giocare un ruolo importante nella sopravvivenza degli acari sottoposti ad alte temperature. Infatti, un tasso di umidità alto, 70-80%, induce una mortalità elevata di *D. gallinae* se sottoposti a picchi di temperatura  $> 42^{\circ}\text{C}$ . Per contro a basse umidità relative, 15-25%, l'essiccamento delle uova può essere registrato anche a temperature non letali,  $35-38^{\circ}\text{C}$ , per un tempo prolungato, più di 24 ore. Mul *et al.* (2014) riportano esperienze europee in Norvegia ed Olanda effettuate per il controllo dell'acaro con le alte temperature con risultati contraddittori. Ebeling (1990) ha evidenziato per altro che l'effetto delle alte temperature induce la degradazione del DNA, modifiche strutturali delle proteine, inattivazione di enzimi e perdite massicce di umidità. Inoltre, l'azione combinata delle alte temperature con l'impiego biocidi può, in alcuni casi, fare registrare un fenomeno di sinergismo.

### 3. Materiali e metodi

La metodologia adottata ha previsto l'impiego di aerotermini carrellati Thermopest® Mod. TVE19 [Fig.2] con un assorbimento di 19KW cadauno, alimentati elettricamente. Queste apparecchiature, dotate di prolunga elettrica, si collegano ai quadri di distribuzione intermedi e, da questi, con cavi di maggiori dimensioni, alle barre di rame poste nei quadri elettrici o ad un gruppo elettrogeno [Fig.3]. Il lavoro si è svolto nel mese di Dicembre 2014 all'interno di un capannone vuoto di 8.400 m<sup>3</sup> da sempre

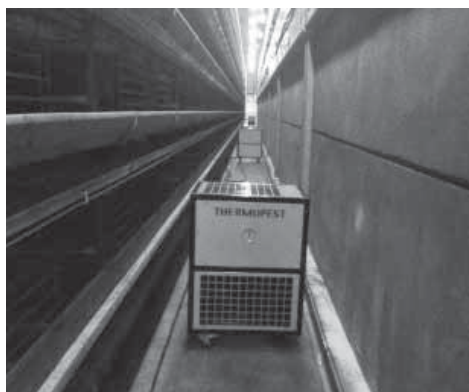


Fig. 2



Fig. 3

adibito ad allevamento di galline ovaiole. L'edificio è costituito da pavimento e da pareti basali in cemento armato, mentre la parte superiore e il tetto con pannelli sandwich. Per la preparazione dei locali non sono state necessarie particolari sigillature come invece richieste per i trattamenti di disinfestazione con gas. Le principali aperture, quali le finestre laterali e le ventole di aerazione, sono state chiuse con scampoli di polietilene dello spessore di 0,15 mm [Fig.4] al fine di contenere il calore all'interno del volume da trattare. Il controllo delle temperature si è reso possibile con i termometri presenti in ciascuno degli aerotermini e con l'utilizzo di 10 termo registratori automatici Escort Mod. ILog 61D32 di cui 1 abilitato anche alla registrazione dell'umidità relativa Escort



Fig. 4



Fig. 5

Mod. RHILog 60D32, sottoposti a taratura nel mese di Ottobre 2014. I dispositivi sono stati posizionati all'interno dell'allevamento, distribuiti omogeneamente [Fig.5], privilegiando i punti più critici della struttura i quali comportano una maggiore dispersione di calore: il perimetro e la base della struttura in cemento, gli angoli e le fosse di contenimento dei nastri di trasporto ed allontanamento della pollina. Oltre a questi, sono stati collocati 2 termo logger dello stesso tipo e modello di cui, uno installato sul muro esterno della struttura per rilevare le condizioni ambientali e il secondo termometro in un locale riscaldato insieme agli artropodi testimone. Tutti i termometri, sono stati programmati per acquisire le temperature ogni 30 minuti ed uno di quelli collocati all'interno ha registrato anche l'umidità relativa dell'ambiente. In coincidenza di ciascun termometro sono stati collocati 10 test biologici [Fig.6] costituiti da provette di vetro così allestite:

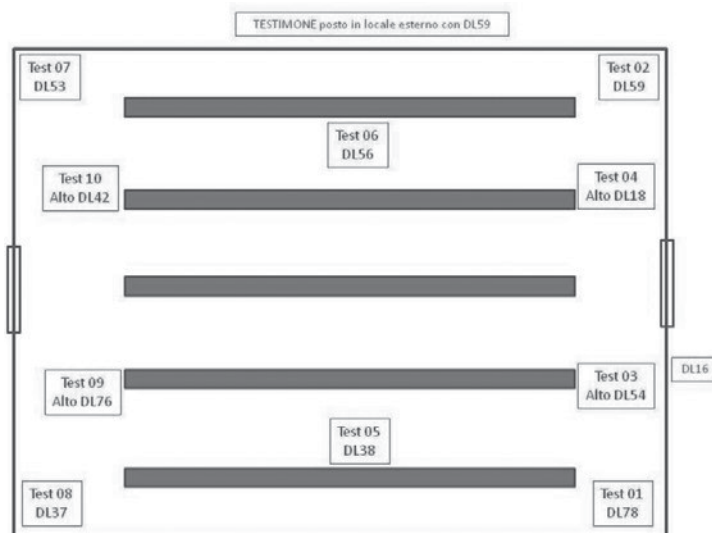


Fig. 6

- 4 contenenti ciascuno 10 esemplari di adulti di *D. gallinae*; (totale 400 adulti);
- 4 contenenti ciascuno 10 pupe di *Calliphora* spp. (totale 400 pupe);
- altri 400 adulti di *D. gallinae* e 400 pupe del dittero sono state impiegate come controllo.

Gli esemplari di *D.gallinae* sono stati prelevati 5 giorni prima dallo stesso allevamento prima del trattamento e mantenuti in laboratorio a temperatura ed umidità controllate. Le pupe del dittero, impupate mediamente da 3 giorni, sono state ottenute da larve provenienti da un negozio specializzato nella vendita di prodotti per la pesca e mantenute in laboratorio per 5 giorni prima del trattamento. Oltre alla registrazione



Fig. 7



Fig. 8

termo-igrometrica i tecnici hanno condotto periodici rilievi con termometri manuali ad infrarossi Testo Mod.830-T1 [Fig.7], al fine di controllare le temperature sulla superficie dei diversi materiali presenti all'interno dell'allevamento. Gli artropodi testati sono stati controllati immediatamente al termine del lavoro per verificare la mortalità degli adulti e dopo 13 giorni per determinare l'efficacia del controllo di eventuali uova di *D.gallinae* e delle pupe di *Calliphora* spp. Inoltre, si è ritenuto utile effettuare un trattamento di disinfestazione per evitare la fuoriuscita e la migrazione di eventuali forme adulte dell'acaro verso i capannoni adiacenti. Il trattamento ha previsto la distribuzione di polveri di silice amorfa Silicosec® all'interno del deposito e lungo tutto il perimetro basale [Fig.8].

#### 4. Risultati e discussione.

Il controllo e la registrazione delle temperature, unitamente alle osservazioni sui test biologici effettuate immediatamente al termine del trattamento e dopo 13 giorni presso i laboratori della Area di Entomologia del Dipartimento di Scienze Agrarie presso l'Università di Bologna, hanno evidenziato una mortalità del 100% sugli esemplari delle pupe di *Calliphora* estratti a 48, 36, 24 e 18 ore e del 100% di mortalità, di *D. gallinae* e estratti a 48, 36 e 24 ore e del 99,75% sul gruppo degli acari test prelevati a 18 ore. L'adulto di *D.gallinae*. trovato vivo ed estratto nel gruppo di acari prelevato



a 18 ore dall'avvio del trattamento è risultato morto dopo 24 ore dal primo controllo [Fig.10]. Gli artropodi testimone non sottoposti al trattamento sono stati mantenuti ad

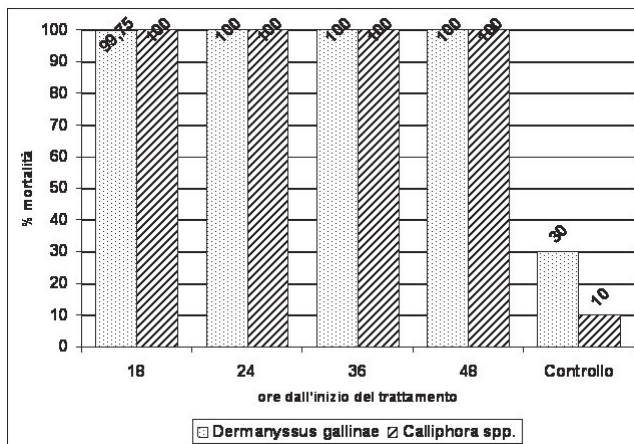


Fig. 10

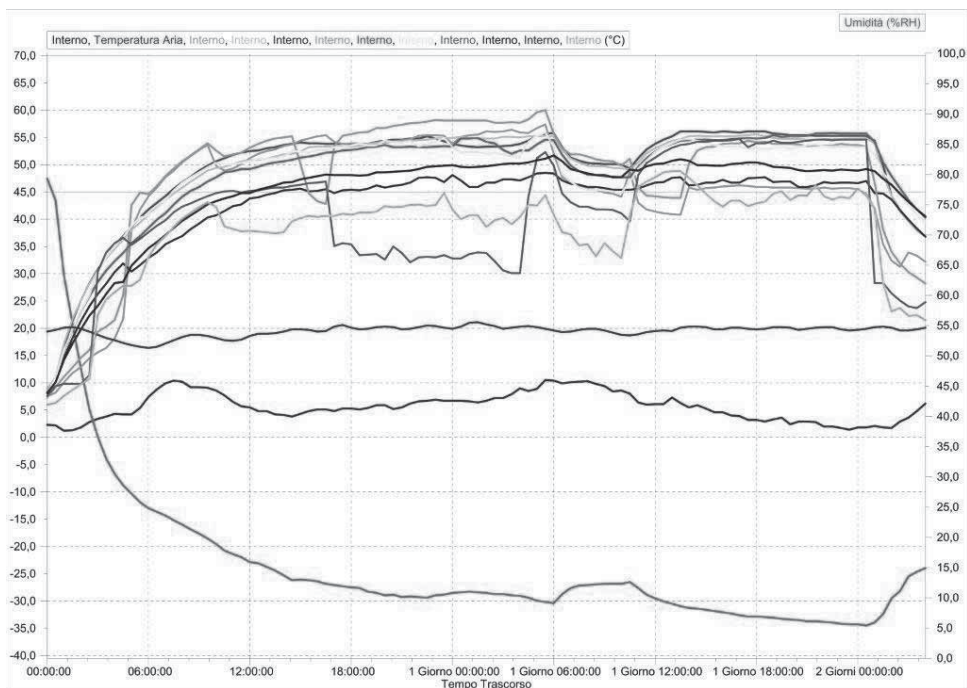


Fig. 9

una temperatura media e costante di 19,5°C, osservando una mortalità del 30% per gli acari e del 10% nei ditteri. Alla luce dei risultati ottenuti, ed osservando i grafici ottenuti dalle registrazioni dei termo logger [Fig.9], si evidenzia come nonostante le

rigide temperature invernali esterne (media di 5,5°C nelle 48 ore), fra la 10<sup>a</sup> e la 12<sup>a</sup> ora si siano raggiunti picchi superiori ai 50°C, con una media sempre superiore ai 45°C. Anche l'umidità relativa ha mostrato una diminuzione netta dai valori iniziali del 79,3% sino al 5,3% durante le ultime ore del trattamento. Valori di U.R. che, come già assodato all'interno di industrie alimentari (Guerra, 2015), riducono fortemente le cariche microbiologiche (muffe e batteri) aerodisperse. Dall'indagine svolta sulla conduttività termica dei diversi materiali, in buona parte presenti anche all'interno del capannone [Fig.11], le plastiche risultano sensibili a temperature

Materiali	Coefficiente dilatazione
Calcestruzzo	10 x 10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
Mattone	6 x 10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
Legno	15 x 10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
Acciaio	12 x 10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
Alluminio	24 x 10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
Vetro	9 x 10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
Plastiche	80 – 200 x 10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>

**Fonte: B. Keller 2005**

Fig. 11

superiori agli 80°C, valore che non è stato mai raggiunta durante la prova. Vale altresì la pena ricordare che vanno evitati incrementi di temperatura repentini in modo da consentire la dilatazione graduale dei materiali esposti. Si ritiene utile sottolineare che l'applicazione di questa metodologia durante periodi stagionali più favorevoli dal punto di vista meteo-climatico, permetterebbe di raggiungere le temperature letali per l'acaro in tempi e con assorbimenti energetici decisamente inferiori, riducendo in modo significativo il costo del trattamento. In definitiva si può affermare che l'applicazione delle alte temperature, pur auspicando ulteriori indagini, può rappresentare un valido ausilio fra le strategie integrate per il controllo di *D. gallinae*.

#### Bibliografia

Chauve C., 1998 – The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control – *Veterinary parasitology*, 79: 239-245.

Ebeling W., 1990 – Heat and boric acid: an example of synergism – *Pest control tecno.*, 18 (4): 44-46.

De Vaney J.A., 1986 – Ectoparasites – *Poultry sci.*, 65: 649-656.



- Guerra P. 2009 – High temperature for pest control in mills – A case history – *Tecnica Molitoria* 2, pp.109-115
- Guerra P., Minetti S., De Cristofano J, Priolo F. 2012 – High temperature treatment for pest control in pasta industries – *Tecnica Molitoria* 11, pp.1220-1231
- Guerra P. 2015 – Disinfestare con il calore gli impianti molitori – *Molini Magazine* 1, pp.28-39
- Kirkwood A. C., 1963 – Longevity of the mite *Dermanyssus gallinae* and *Liponyssus sylviarum*. *Exp. Parasitol.*, 14: 514-516.
- Maurer V., Baumgartner J., 1992 – Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae)- *Experimental and Applied Acarology*, 15: 27-40.
- Mul M., van Niekerk T., Chirico J., Maurer V., Kilpinen O., et al. 2009 – Control methods for *Dermanyssus gallinae* in system for laying hens : results of an international seminar. *World Poult. Sci. J.* 65: 589-99.
- Nordenfors H., Hoglund J., Uggla A., 1999 – Effects of temperature and humidity on oviposition, molting, and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) – *Journal of medical entomology*, 36 (1): 68-72.
- Rust M. K., Reiersen D., 1997 – Use of extreme temperatures in urban insect pest management – *Lethal temperatures in integrated pest managements* (G.J. Hallwan, D.L.Denlinger, eds) Westview Press, Boudler, CO: 247-264.
- Sparangano O.A.E., Geroge D.R., Harrington D.W.J., and Giangaspero A., 2014 - Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annu. Rev. Entomol.* 59:447-66.
- Tucci E.C., Prado A.P., Araújo R.P., 2008 – Development of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) at different temperatures. *Vet. Parasitol.* 155:127-32.

## SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA DI UN CEPPLO DI IBV GENOTIPO Q1-LIKE ISOLATO IN ITALIA NEL 2013

Listorti V.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Naylor C.J.<sup>3</sup>, Laconi A.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Drigo M.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – ITALIA*

<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*

<sup>3</sup> *Department of Infection Biology, Faculty of Health and Life Sciences, University of Liverpool, Leahurst Campus, Neston CH64 7TE, United Kingdom*

### Summary

Since 1996 a new Infectious Bronchitis virus (IBV) genotype, referred to as Q1, circulated in China and was reported for the first time in Italy in 2011, associated with an increase of mortality, kidney lesions and proventriculitis. During a 2013 Northern Italian outbreak of respiratory disease in a chicken flock, an IBV strain was detected by RT-PCR and characterized as Q1-like. The virus was isolated and named  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13. All coding regions of the isolate were sequenced and compared with 130 complete genome sequences of IBV and TCoV, downloaded from ViPR, and showed most identity with a Chinese strain CK/CH/LDL/97I (p-distance=0.044). To identify potential recombination events a complete genome SimPlot analysis was carried out which revealed the presence of possible multiple recombination events, but the minor parent strains remained unknown. A phylogenetic analysis of the complete S1 gene was performed using all complete S1 sequences available on ViPR and showed that the isolate clustered with an Q1-like strain isolated in Italy in 2011 (p-distance=0.004) and a group of Chinese Q1-like strains isolated from the mid 90's (p-distance=0.001 with GenBank Accession Number CK 577410). It could be hypothesized that the isolate descended from the Italian 2011 Q1-like strain or was the result of a separate introduction from China, through commercial trade or migratory birds; but the data did not distinguish between these possibilities

### INTRODUZIONE

Il virus della Bronchite Infettiva (IBV) è un virus a polarità positiva, a singolo filamento di RNA appartenente alla famiglia delle *Coronaviridae*, genere *Coronavirus*. Presenta un genoma di circa 27.6 Kb (5-UTR-1a/1ab-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3 UTR). IBV è responsabile di gravi perdite economiche nel settore avicolo (Jackwood e de Wit, 2013) dovute a infezioni del tratto respiratorio superiore, associate anche a infezioni batteriche secondarie, e dei reni. Nei riproduttori può colpire anche l'apparato riproduttore influenzando negativamente l'ovodeposizione e la qualità delle uova prodotte.

Le strategie di controllo della malattia sono principalmente basate sul largo utilizzo della vaccinazione sebbene l'immunità indotta dai vaccini è a volte poco protettiva a causa della limitata cross-protezione esistente tra i diversi genotipi (de Wit et al.,

2011; Cook et al., 2012). Infatti, il genoma virale di IBV è incline a mutazioni puntiformi (sostituzioni, inserzioni e delezioni) e a più estensivi fenomeni di ricombinazione, che risultano nell'origine di un gran numero di varianti di IBV (Thor et al., 2011; Jackwood et al., 2012).

Dal 1996 la presenza di un nuovo genotipo del virus di IBV, denominato Q1, è stata evidenziata in Cina (Yu et al., 2001), ed è stato riportato per la prima volta in Italia nel 2011, associato ad un aumento di mortalità preceduto da sintomatologia respiratoria, casi di nefrite e proventricolite (Toffan et al., 2011; Toffan et al., 2013).

Nel 2013, durante un focolaio di malattia respiratoria in un allevamento di broiler localizzato in nord Italia, è stata nuovamente riscontrata la circolazione di un ceppo genotipizzato, sulla base del sequenziamento della regione ipervariabile del gene S1, come Q1-like.

Il virus è stato quindi isolato e denominato  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13, in accordo con la nomenclatura proposta recentemente per IBV (Ducatez et al., 2014). Nel presente lavoro, l'intero genoma è stato sequenziato e comparato con 130 sequenze di genoma completo di IBV e *Turkey Coronavirus* (TCoV), scaricate da ViPR. Per identificare eventuali eventi di ricombinazione è stata eseguita un'analisi con l'utilizzo del software SimPlot sull'intero genoma. In aggiunta, la relazione fra il ceppo  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13 e altri stipiti isolati a livello mondiale è stata valutata in modo più approfondito confrontandola, tramite un'analisi filogenetica, con il più ampio database di sequenze complete del gene S1. Infine, sono state discusse le ipotesi sull'origine di questo isolato.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento, diagnosi e tipizzazione di IBV.*

Nel maggio del 2013, sono stati prelevati 10 tamponi orofaringei, da animali che presentavano sintomatologia respiratoria, in un allevamento di broiler di 35 giorni di età, del nord Italia. I tamponi sono stati immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti refrigerati sino al momento della preparazione dell'inoculo per l'isolamento virale. In aggiunta da questo è stato estratto l'RNA virale utilizzando il kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN S.r.l., Milano, Italia). Ai fini della diagnosi di IBV e genotipizzazione il campione è stato amplificato utilizzando la metodica descritta da Jones et al. (2005) e successivamente sequenziato. L'analisi della sequenza ottenuta ne ha permesso la caratterizzazione come genotipo Q1.

### *Isolamento virale*

Per l'isolamento virale di IBV sono state utilizzate colture di anelli tracheali di embrione di pollo (TOC) (Cook et al., 1976). La ciliostasi osservata tre giorni post-infezione è stata considerata come indicativa della presenza di IBV. La conferma dell'isolamento è stata eseguita mediante RT-Nested PCR (Jones et al., 2005). Il virus isolato è stato denominato  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13.

### *Sequenziamento e analisi intero genoma*

Dal terreno raccolto dal terzo passaggio in TOC è stato estratto l'RNA virale utilizzando il kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN S.r.l., Milano, Italia). Un protocollo di RT-PCR è stato messo a punto per amplificare il genoma completo di IBV, attraverso differenti PCR, i cui ampliconi presentassero estremità sovrapposte. La retrotrascrizione è stata fatta usando il kit Maxima H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA) mentre la PCR è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA).

Per massimizzare la resa finale e limitare la presenza di prodotti aspecifici, entrambe le reazioni sono state ottimizzate provando diverse combinazioni di primer, di temperatura e di concentrazione dei reagenti. I prodotti di PCR sono stati inviati ad un servizio esterno di sequenziamento (Macrogen Europe).

Tutti i cromatogrammi sono stati analizzati utilizzando FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). Le sequenze sono state allineate con una sequenza IBV di riferimento (*Accession Number* JQ088078) utilizzando Geneious (<http://www.geneious.com/>) e la sequenza consenso è stata generata utilizzando lo stesso software. Centotrenta sequenze di genomi completi di IBV e TCoV sono state scaricate da ViPR (Pickett et al., 2012) ed allineate utilizzando il software MAFFT 7 (Katoh e Standley, 2013). A partire da questo database sono stati ricostruito un albero e un network filogenetico utilizzando rispettivamente il metodo MaximumLikelihood (ML) implementato in PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) e l'algoritmo NeighborNet del software SplitsTree4 v4.12.3 (Huson and Bryant, 2010).

Quest'ultimo ha permesso di avere una panoramica preliminare sulla presenza e frequenza dei fenomeni di ricombinazione. Questi sono stati poi approfonditi, in particolare per il ceppo in esame, utilizzando il software SimPlot.

### *Sequenziamento e analisi regione codificante per la proteina S1*

La regione codificante per la proteina S1 è tradizionalmente utilizzata per genotipizzare e classificare IBV. Un'analisi filogenetica è stata eseguita a partire da tutte le sequenze complete o quasi complete (almeno 1550 bp) del gene S1 scaricate da ViPR (<http://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>). Per incrementare la risoluzione nella definizione delle relazioni fra ceppi, una nuova analisi è stata svolta su un sottoinsieme di queste sequenze che includesse anche quella del ceppo  $\gamma$ CoV/Ck/Italia/I2022/13.

## **RISULTATI**

Questo lavoro riporta per la prima volta il sequenziamento del genoma completo (regioni codificanti) di un ceppo IBV genotipo Q1 ( $\gamma$ CoV/Ck/Italia/I2022/13) isolato in Italia da broilers con sintomatologia respiratoria. È stata ottenuta una sequenza di 27403 nt (minima copertura 2X). L'albero filogenetico basato sul genoma completo evidenzia che il ceppo  $\gamma$ CoV/Ck/Italia/I2022/13 clusterizza con due sequenze cinesi

nominate *Accession number* JX195177 e JX195178 (p-distance=0.044). Il network filogenetico conferma la stretta correlazione di questi due ceppi con il nostro isolato, sebbene la presenza di molteplici reticolazioni suggerisca la presenza di frequenti fenomeni di ricombinazione (Figura 1). La comparazione con le 130 sequenze di genoma completo disponibili conferma la stretta correlazione tra il nostro ceppo e JX195177/JX195178, nella maggior parte del genoma, eccezion fatta per le regioni 841-2812, 3389-9926, 22355-23143 e 25356-26027. Questa variazione nella percentuale d'identità in queste regioni suggerisce fortemente che  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13 ha subito fenomeni di ricombinazione. Sfortunatamente la ricerca eseguita mediante il software BLAST, rivela l'assenza di correlazioni strette tra le sequenze di tali regioni e quelle disponibili nei database, rendendo impossibile l'identificazione dei ceppi parentali minori. L'albero filogenetico basato sulle sequenze codificanti per la proteina S1 confermano che il nostro isolato clusterizza con JX195177/JX195178. Sebbene questo cluster includa anche una sequenza Italiana (JQ290229), la minor distanza genetica si riscontra nei confronti di stipiti Cinesi (Figura 2).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il ceppo IBV genotipo Q1 ( $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13) isolato e caratterizzato in questo lavoro, risulta strettamente correlato a stipiti cinesi, classificati come appartenenti al genotipo Q1. Tuttavia una significativa, sebbene minore, percentuale di identità nucleotidica nel gene S1 è stata anche riscontrata con un ceppo IBV (JQ290229) isolato in Italia nel 2011 (Toffan et al., 2011).

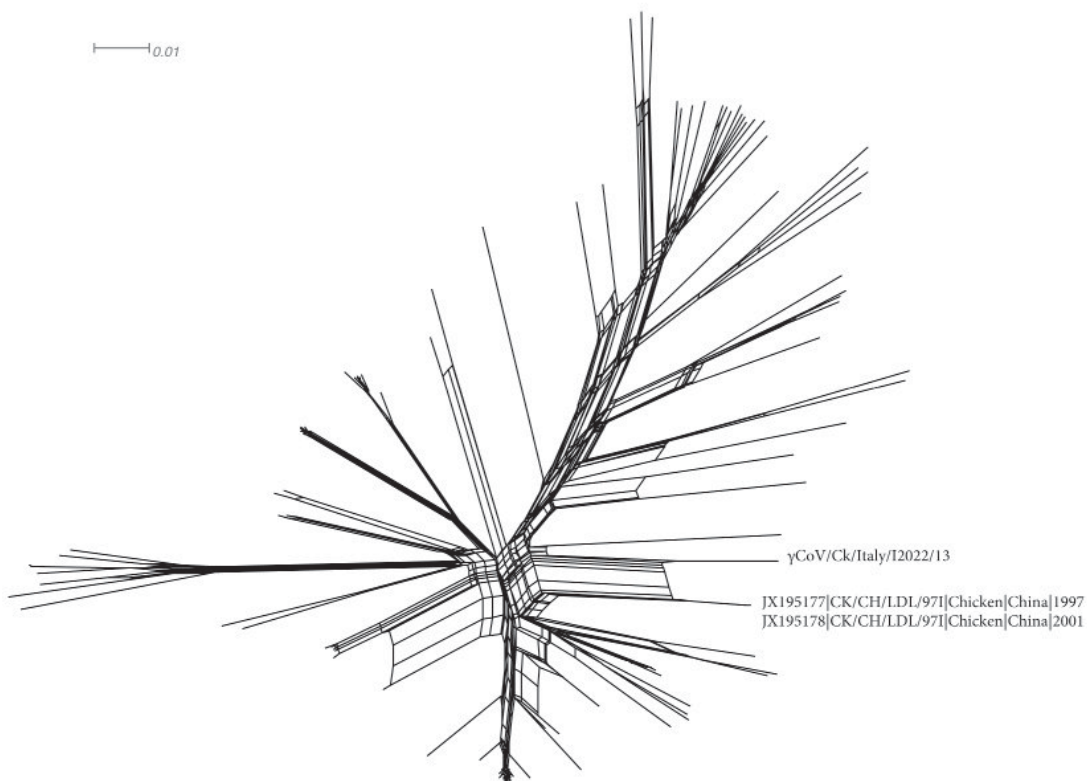
Sulla base dei risultati ottenuti sono state proposti diversi scenari sulle origini del ceppo  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13. È infatti possibile ipotizzare che il ceppo isolato nel presente lavoro sia un discendente del ceppo JQ290229, circolante ed evolutosi in Italia. Alternativamente entrambi potrebbero essere stati introdotti dall'Asia, in momenti distinti, attraverso importazioni non dichiarate o per mezzo di uccelli migratori (Cavanagh et al., 2005). Anche se la correlazione più stretta con i ceppi cinesi rende la seconda ipotesi più probabile, la possibilità di un'evoluzione convergente fra ceppi italiani e cinesi non può essere esclusa. Un'indagine più approfondita su tratti più ampi di genoma potrebbe, anche grazie alla valutazione e comparazione dei pattern di ricombinazione, fare luce sulle vie di introduzione di questo genotipo nel nostro Paese. È interessante notare come altre due sequenze italiane (JQ901492 e KJ941019) siano parte del medesimo cluster di  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13 (p-distance di 0.058 e 0.06) (Figura 2). Il ceppo JQ901492 fa parte del genotipo 624I, che è stato ipotizzato come progenitore del genotipo Q1, importato in passato in Cina e, dopo un periodo di evoluzione indipendente, reintrodotta in Italia. La grande differenza genetica tra la sequenza JQ901492 e quella del primo isolato Q1, campionato solo qualche anno dopo, difficilmente, però, supporta questa ipotesi. Sfortunatamente anche se il genotipo 624I è stato riportato e sequenziato in Italia a partire dagli anni 60 (Taddei et al., 2012), il ceppo JQ901492, campionato nel 1994, rappresenta la più vecchia sequenza disponibile del genotipo 624I. La scarsità di dati impedisce quindi di supportare o screditare tale ipotesi. Ancora una volta viene messa in luce l'importanza di rendere disponibili alla comunità scientifica le sequenze ottenute.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D, (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34: 439-448.
2. Cook JK, Darbyshire JH, Peters RW, (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* 50: 109-118.
3. Cook JK, Jackwood M, Jones RC, (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41: 239-250.
4. de Wit JJ, Cook JK, van der Heijden HM, (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40: 223-235.
5. de Wit J, Guerrero P, Calvo J, Hidalgo H, (2012). Report of the genotyping, pathotyping, and protectotyping of resent from Chile. Proceedings of the VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, 18-21 giugno 2012, Rauischholzhausen, Germania, pp. 61-67.
6. Ducatez M, (2014). Towards suggestions on a unified nomenclature and classification of IBV strains. Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. 2nd Annual Meeting of the Cost Action FA1207. 17-20 giugno 2014, Rauischholzhausen, Germania: p. 416.
7. Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O, (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321.
8. Huson DH, Bryant D, (2010). User Manual for SplitsTree4 V4.11.3.
9. Jackwood MW, Hall D, Handel A, (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1305-1311.
10. Jackwood MW e De Wit S, (2013). Infectious bronchitis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, *Diseases of poultry*, 13<sup>o</sup> edizione, Wiley-Blackweel, pp. 139-159.
11. Jones R, Worthington K, Capua I, Naylor C, (2005). Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Veterinary Record-English Edition* 156: 646-647.
12. Katoh K, Standley DM, (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772-780.
13. Pickett BE, Greer DS, Zhang Y, Stewart L, Zhou L, Sun G, Gu Z, Kumar S, Zaremba S, Larsen CN, Jen W, Klem EB, Scheuermann RH, (2012). Virus pathogen database and analysis resource (ViPR): a comprehensive bioinformatics database and analysis resource for the coronavirus research community. *Viruses* 4: 3209-3226.
14. Taddei R, Tosi G, Boniotti MB, Casadio M, Fiorentini L, Fabbi M, Massi P, (2012). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della Bronchite Infettiva Aviare isolati in Italia tra il 1963 ed il 1989. Atti del LI Convegno Annuale della Società Italiana di Patologia Aviare, 11-12 ottobre 2012, Parma, Italia, pp. 316-325.
15. Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH, Jackwood MW, (2011). Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3: 1777-1799.

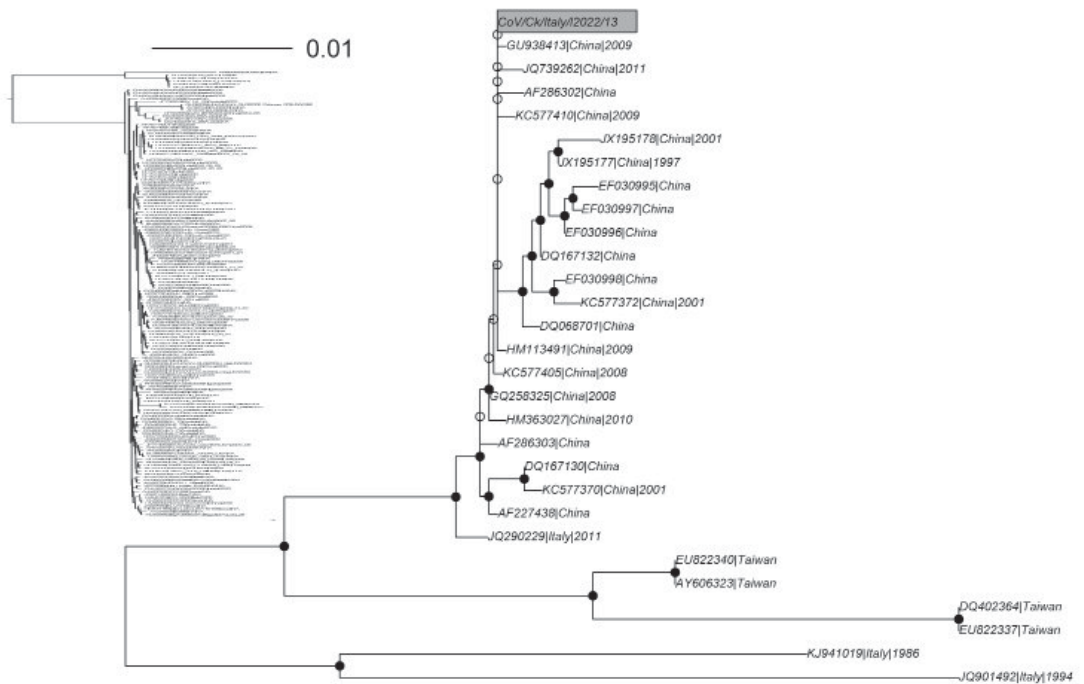


16. Toffan A, Bonci M, Bano L, Valastro V, Vascellari M, Capua I, Terregino C, (2013). Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. *Vet. Ital.* 49: 347-355.
17. Toffan A, Terregino C, Mazzacan E, Castaldello I, Capua I, Bonci M, (2011). Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Vet. Rec.* 169: 212-213.
18. Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, Kwang J, (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45: 416-424.



**Figura 1.** Network filogenetico basato sull'algoritmo NeighborNet comprendente 130 sequenze di genomi completi di IBV e TCoV. Per una più semplice comprensione sono indicati solo il ceppo riportato in questo studio e quelli ad esso strettamente correlati (*Accession number* JX195177 e JX195178).





**Figure 2.** Albero filogenetico ottenuto con il metodo Maximum-Likelihood (ML) a partire dalle sequenze strettamente correlate con  $\gamma$ CoV/Ck/Italy/I2022/13 (rettangolo grigio). I nodi con valori di *bootstrap* maggiori del 70%, tra il 70 e il 50% e minori del 50%, sono rappresentati rispettivamente in nero, grigio e bianco. Il cluster corrispondente è evidenziato in rosso nell'albero basato su tutte le sequenze di S1 analizzate (inserto di sinistra). Per facilitare la rappresentazione grafica le sequenze con valori di identità nucleotidica superiore al 95% sono state aggregate nello stesso cluster e solo una sequenza per ogni cluster è stata selezionata.

# DATI EPIDEMIOLOGICI SULLA CIRCOLAZIONE IN ITALIA DEL NUOVO GENOTIPO IBDV ITA

Lupini C.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Bonci M.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Laconi A.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Morandini E.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – Italia*

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

<sup>3</sup> *Agricola Tre Valli, Via Valpantena, 18/G, 37138 Quinto di Valpantena (VR), Italia*

## Summary

Significant economic losses can affect the poultry industry due to the consequences of immunosuppression induced by viral infections. This study reports the results of a survey, conducted in 2012-2014 on 59 farms located in Northern and Central Italy, aimed to investigate the diffusion of the new genotype ITA of infectious bursal disease virus (IBDV) recently detected in Italy. All flocks, out of one, were vaccinated for IBD. Seventeen longitudinal studies and 42 “one off” sampling performed during routine diagnostic activity for IBD, were performed. Samples of the Bursa of Fabricius were collected for virus detection by a RT-PCR protocol designed in the hypervariable region of the VP2, from 10 birds per flock, at different time of life. The RT-PCR products were sequenced and the sequences aligned with the available database logged homologous sequences. The IBDV strain ITA was the most detected genotype, being found in 31 out of 59 farms. The actual pathogenicity of the IBDV ITA strain, as well as the degree of protection offered by common vaccination schedules, will be further investigated

## INTRODUZIONE

Le Bursite infettiva (IBD) è una malattia immunosoppressiva del pollo caratterizzata dall'interessamento dei linfociti B e della borsa di Fabrizio dove causa necrosi e deplezione linfocitaria (Etteradossi e Saif, 2013). L'impatto economico di questa malattia è notevole, legato alla mortalità, alle perdite produttive ed all'immunosoppressione che rende gli animali più sensibili a un gran numero di patologie, fra cui le colisetticemie, e riduce l'efficacia delle vaccinazioni (Van Den Berg, 2000). L'agente eziologico è un *Avibirnavirus* (IBDV), virus a RNA a doppia elica, caratterizzato da una notevole variabilità sia in termini antigenici sia di virulenza. Esistono, infatti, sia ceppi in grado di dare forme cliniche gravi, accompagnate da notevole mortalità ed immunosoppressione che ceppi causa di forme subcliniche, dove l'esito unico dell'infezione è l'immunosoppressione. L'insorgenza di nuove varianti è un evento comune per questo virus, esito dell'occorrenza e dell'accumularsi nel genoma di mutazioni in punti chiave per la virulenza o per l'antigenicità, anche a seguito della pressione selettiva esercitata dalla vaccinazione di massa (Etteradossi e Saif, 2013). La proteina del capsido VP2 è considerata la sede principale sia dei siti antigenici riconosciuti dagli anticorpi neutralizzanti che di quelli fondamentali per la

virulenza ed il tropismo cellulare. Dopo la sua prima comparsa negli anni '60 negli USA (Cosgrove, 1962), la Bursite Infettiva si è diffusa a livello mondiale ed è stata adeguatamente controllata con vaccini classici sino alla fine degli anni '80, quando il panorama mondiale si è modificato sia per la comparsa di varianti antigeniche subcliniche negli USA (Rosenbeger e Cloud, 1986), che per la diffusione di ceppi a elevata virulenza in Europa (vvIBDV) (Van Den Berg *et al.*, 1991). In Italia i ceppi vvIBDV hanno causato negli ultimi anni gravi danni al patrimonio avicolo (Moreno *et al.*, 2007, Moreno *et al.*, 2010), e solo l'introduzione sul mercato di vaccini di nuova generazione (ricombinanti o ad immunocomplessi) ne ha permesso il controllo. Scarsi o addirittura assenti sono invece nel nostro Paese i dati sulla diffusione e sull'impatto economico delle forme subcliniche di IBD. Recentemente è stata svolta un'indagine mediante RT-PCR per IBDV in alcuni allevamenti di polli da carne affetti da ripetuti casi di colisetticemia, vaccinati per IBDV (Bonci *et al.*, 2013). L'indagine ha permesso di evidenziare 4 ceppi di IBDV (denominati ITA01, ITA02, ITA03, ITA04) la cui analisi di sequenza a livello della proteina VP2, ha evidenziato un genotipo dalle caratteristiche uniche, diverse da tutti i ceppi presenti in *GenBank*. Con ogni probabilità si tratta di una variante nuova, in grado di eludere la protezione dei vaccini in uso. Il rinvenimento della variante in allevamenti affetti da infezioni batteriche ripetute fa pensare che essa causi forme subcliniche immunosoppressive, analoghe a quelle osservate negli USA.

Allo scopo di delineare un quadro della situazione di campo il più possibile aderente alla realtà, è stata svolta sul territorio nazionale, in particolare nelle aree a rischio d'infezione, un'indagine sulla diffusione del genotipo ITA nell'allevamento del broiler. Il progetto ha previsto studi longitudinali e campionamenti singoli, per la ricerca di IBDV mediante RT-PCR. I ceppi evidenziati sono stati caratterizzati mediante analisi di sequenza della regione ipervariabile della proteina VP2. Dove possibile i risultati sono stati integrati con i dati produttivi d'allevamento ed i piani vaccinali applicati.

## **MATERIALI E METODI**

### *Allevamenti*

Lo studio è stato svolto in allevamenti di broiler situati in Veneto, Lombardia, Emilia Romagna e Marche in un periodo compreso fra Ottobre 2012 e Dicembre 2014. Per ogni allevamento, quando possibile, veniva compilata una scheda in cui venivano riportati: le vaccinazioni eseguite per IBDV, l'eventuale sintomatologia clinica pregressa o in atto e i dati produttivi di allevamento.

### *Campionamento*

In 17 allevamenti sono stati eseguiti studi longitudinali. A cadenza settimanale, 10 soggetti per gruppo sono stati sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico, durante il quale è stata prelevata la borsa di Fabrizio per indagini diagnostiche molecolari. I campioni sono stati processati in *pool* per data di campionamento e per allevamento. Gli animali e la rispettiva Borsa di Fabrizio sono stati pesati per il calcolo del *Bursal Index*.

Il resto degli allevamenti (42) sono stati campionati durante indagini cliniche e necroscopiche di *routine*, in caso di sospetto di Bursite Infettiva.

#### *Bursal index*

Il calcolo del *Bursal Index* (BI) è stato eseguito secondo la seguente formula: peso della Borsa di Fabrizio/peso della carcassa x 100.

#### *Estrazione dell'RNA virale ed RT-PCR*

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata con il kit del commercio QIAamp Viral RNA® (Qiagen) conformemente alle istruzioni della casa produttrice, a partire da omogenati di borse in *phosphate buffered saline* (PBS). L'RT-PCR è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Jackwood *et al.* (2006), che consente di amplificare un frammento di 743pb del gene codificante per la VP2, situato nella regione ipervariabile della stessa.

#### *Sequenziamento ed analisi di sequenza*

I prodotti amplificati sono stati sequenziati, in entrambe le direzioni, presso il centro di sequenziamento MacroGen Europe (Amsterdam). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit ed allineate e confrontate, utilizzando il software Clustal W, alle sequenze del gene della VP2 di ceppi di IBDV di riferimento (compresi i ceppi vaccinali) presenti in *GenBank*.

## **RISULTATI E DISCUSSIONI**

I risultati dello studio dimostrano un'elevata diffusione dell'infezione da IBDV negli allevamenti campionati. I ceppi evidenziati appartengono a diversi genotipi e **ciò concorda con i dati** ad oggi disponibili sulla situazione epidemiologica nazionale (Moreno *et al.*, 2007; Massi *et al.*, 2014).

Nei campionamenti singoli, eseguiti tutti nel periodo 2013-2014, sono stati evidenziati 42 ceppi di IBDV; l'analisi di sequenza ha permesso di evidenziare che: 12 ceppi mostravano la più alta % di omologia (97-100%) con ceppi vaccinali, 4 con ceppi *very virulent*, 1 ceppo con il ceppo classico HPR2 ma la maggior parte (28 su 42) con il genotipo ITA. Quest'ultimo genotipo è stato evidenziato in allevamenti in cui erano applicati diversi programmi vaccinali.

Seppur con frequenze diverse, gli studi longitudinali (Tabelle 1 e 2) hanno permesso di evidenziare gli stessi genotipi dei campionamenti singoli. Ceppi di origine vaccinale sono stati rinvenuti da 19 a 46 giorni di vita; in questi allevamenti la vaccinazione era stata eseguita in incubatoio o in allevamento a 14-18 giorni di vita. Il nuovo genotipo ITA è stato evidenziato in 3 allevamenti. Nell'allevamento 6 è **stato possibile evidenziarlo** solo al 35° giorno di vita. All'esame necroscopico 5 dei 10 soggetti campionati in questo allevamento presentavano atrofia della borsa. Inoltre venivano riportate enterite catarrale e coccidiosi cecale. Questi dati, associati ad una % percentuale di mortalità che non si discosta dal valore atteso, farebbero supporre un andamento subclinico della infezione da IBDV del genotipo ITA. Il genotipo ITA è stato inoltre rilevato negli allevamenti 11 e 12; nel primo caso nel gruppo campionato non

sono stati riportati particolari problemi, nel secondo caso, invece, gli animali mostravano grave enterite, fragilità ossea e performances scadenti che, associate ad elevata mortalità, hanno costretto alla macellazione anticipata del gruppo.

## CONCLUSIONI

Lo studio ha evidenziato un'ampia diffusione a livello nazionale del genotipo IBDV ITA in broiler regolarmente vaccinati. Vista la notevole variabilità di sintomatologia e performances produttive osservate negli allevamenti positivi ad ITA, rimane ancora non chiaro il grado di patogenicità di questo ceppo. Per ottenere dati definitivi a riguardo sarà necessario svolgere uno studio di patogenicità in condizioni d'isolamento biologico per eliminare tutte le variabili (di natura ambientale, microbiologica, alimentare ecc.) che in condizioni di campo, nei casi spontanei di malattia, alterano il quadro determinato dal virus.

Al fine di attuare piani vaccinali più efficaci, sarà inoltre opportuna la valutazione sperimentale della protezione conferita nei riguardi del genotipo ITA dai vaccini di più comune impiego nella profilassi della Bursite infettiva.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bonci M, Giovanardi D, Pesente P, Morandini E, Lupini C, Cecchinato M, Rossi G, Catelli E. (2013) Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della Bursite Infettiva isolati recentemente in Italia. Atti 52° Convegno Annuale SIPA Forlì 11-12 Aprile 2013 - pp. 136-144.
2. Cosgrove AS (1962) An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases* 6: 385-389.
3. Etteradossi N, Saif YM (2013) Infectious Bursal Disease in “Disease of Poultry – 13th edition” chapter 7, Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Venugopal N. – Wiley-Blackwell by John Wiley & Sons, Inc. AAAP, Ames, Iowa. pp 219-246.
4. Jackwood DJ, Cookson KC, Sommer-Wagner SE, Le Galludec H, JJ de Wit (2006) Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe, *Avian Diseases* 50: 532-536.
5. Massi P, Fiorentini L, Barbieri I, Casadio M, Tosi G (2014) 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. Atti 53° Convegno Annuale SIPA Salsomaggiore Terme (PR) 8 - 9 Maggio 2014 - pp. 155-167.
6. Moreno AM, Fallacara F, Barbieri I, Tosi G, Rivallan G, Etteradossi N, Ceruti R, Cordioli P (2007) Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005”, *Avian Diseases* 51: 863-872.

7. Moreno A, Barbieri I, Ceruti R, Morandini E, P Cordioli (2010) Caratterizzazione genomica di ceppi del virus della malattia di Gumboro isolati in Italia nel periodo 2006-2009. Atti 49° Convegno Annuale SIPA 2010, Forlì 29-30 Aprile 2010 - pp. 199-203.
8. Rosenberger J, SS Cloud (1986) Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses, *Journal American Veterinary Medical Association* 189: 357 [abst.].
9. Van den Berg TP (2000) Acute Infectious bursal disease in poultry: A review, *Avian Pathology* 29: 175-194.
10. Van Den Berg TP, Gonze M. & G. Meulemans (1991) Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterization of a highly virulent strain, *Avian Pathology* 20: 133-143.

**Tabella 1.** Risultati degli studi longitudinali effettuati in Veneto e Lombardia per ricerca di IBDV.

Allevamento	Regione	Vaccinazione (età gg)	RT-PCR (genotipo)		Bursal Index (%) <sup>§</sup>		Dati produttivi		
			19-21gg	32-35gg	19-21gg	32-35gg	Mortalità (%)	IC	Scarto al macello (%)
1	Veneto	Incubatoio	-	+vac	14	7	4,80	1,93	0,89
2	Veneto	Intermedio (14)	-	+vac	13	6	4,54	1,90	1,85
3	Veneto	Intermedio (14)	-	+vv	14	5	6,70	1,80	Nd
4	Lombardia	Intermedio (18)	-	-	20	5	4,43	1,79	0,77
5	Lombardia	Incubatoio	+vac	+vac	13	6	5,69	1,75	1,34
6	Lombardia	Intermedio (14)	-	+ITA	20	18	4,72	1,80	0,30

<sup>§</sup>media di 10 soggetti

- negativo a RT-PCR per IBDV

+ positivo a RT-PCR per IBDV

vac = massima omologia al sequenziamento con ceppo vaccinale;

vv = massima omologia al sequenziamento con ceppo *very virulent*;

ITA = massima omologia al sequenziamento con genotipo ITA

IC = indice di conversione



**Tabella 2.** Risultati degli studi longitudinali effettuati in Marche ed Emilia Romagna per ricerca di IBDV.

Allevamento	Regione	Vaccinazione	RT-PCR(genotipo)				
			13-16gg	20-22gg	24-29gg	32-38gg	43-46gg
7	Emilia Romagna	Incubatoio	-	-	+vv	+vv	-
8	Emilia Romagna	Intermedio (18gg)	-	+non seq	-	+vac	-
9	Emilia Romagna	Intermedio (14gg)	-	-	-	+vac	-
10	Emilia Romagna	Incubatoio	+non seq	-	-	+vv	-
11	Emilia Romagna	Intermedio (14gg)	-	-	+ITA	-	-
12	Emilia Romagna	Incubatoio	-	+ITA	+ITA	-	n.e.
13	Marche	n.d.	-	-	+vac	+vv	+vac
14	Marche	Incubatoio	-	-	+clas	+non seq	+clas
15	Marche	Intermedio (in allev)	-	-	+clas	+clas	-
16	Marche	Incubatoio	-	-	-	-	-
17	Marche	Incubatoio	-	-	+clas	+clas	-

- Negativo a RT-PCR per IBDV

+ positivo a RT-PCR per IBDV

Non seq= prodotto non sequenziabile

n.e.= campionamento non eseguito

vac=massima omologia al sequenziamento con ceppo vaccinale;

vv= massima omologia al sequenziamento con ceppo *very virulent*;

ITA= massima omologia al sequenziamento con genotipo ITA

clas= massima omologia al sequenziamento con genotipo classico

# NUOVO PROTOCOLLO DI QPCR PER LA DIAGNOSI DI *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR GALLINARUM

Marino M.<sup>1</sup>, Pugliese N.<sup>1</sup>, Circella E.<sup>1</sup>, Caroli A.<sup>1</sup>, Legretto M.<sup>1</sup>, De Virgilio C.<sup>2</sup>, Romito D.<sup>1</sup>, Camarda A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia*

## Summary

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) is the causative agent of fowl typhoid, a major threat in poultry which causes mortality and high morbidity. The standard method for detection of *S. Gallinarum* relies on culture isolation and it requires more than five days for final confirmation. Recently, molecular methods have been developed, but they are not considered as golden standards, also because they do not allow pathogen quantification.

Therefore, we developed a real time quantitative PCR (qPCR) which may represent a fast and accurate method that reduce drastically the extent of the analytical process, while being sensitive and specific. In order to grant specificity, a specific probe has been designed to detect the amplification products. The method has been tested *in vitro* and it has been proved to be effective for detection and absolute quantification of *S. Gallinarum*. In particular we found high sensitivity and specificity, with accuracy higher than 98%. Therefore, we find that the method may be suitable for diagnostic and other application, such as environmental monitoring.

## INTRODUZIONE

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) è un batterio Gram negativo, anaerobio facoltativo, immobile, ed è l'agente eziologico della tifosi aviare. La malattia può causare, nei volatili, diarrea, anoressia, calo della ovodeposizione e mortalità elevata, con conseguenti gravi perdite economiche per gli allevatori. (Shivaprasad, 2003).

La tifosi aviare è una malattia soggetta a denuncia. L'organizzazione internazionale della sanità animale, inoltre, ha emesso specifiche direttive per la prevenzione e il trattamento della malattia (OIE, 2010b), ed ha stabilito i criteri per la diagnosi differenziale tra Salmonelle mobili e immobili.

Attualmente, le metodiche standard sono basate sulle tecniche di isolamento ed identificazione culturali, esplicitate dalla norma ISO6579:2002, che consiste nel prearricchimento non selettivo seguito da una fase di arricchimento selettivo e successive colture su terreni selettivi, a cui segue l'identificazione basata su test biochimici e la sierotipizzazione (Popoff *et al.*, 1997) (ISO 6579:2002).

Tuttavia, tale metodica è laboriosa e generalmente necessita di almeno cinque giorni per giungere all'individuazione del germe.

Per ridurre i tempi di identificazione della *S. Gallinarum*, sono stati sviluppati diversi

saggi molecolari tra cui un protocollo di seminested PCR validato per l'identificazione di *S. Gallinarum* che si è dimostrato particolarmente sensibile, oltre a ridurre notevolmente i tempi di analisi rispetto alle procedure standard batteriologiche (Pugliese *et al.*, 2011). Queste metodiche molecolari, tuttavia, consentono solo di valutare la positività di un campione al germe ma non permettono la quantificazione del DNA bersaglio eventualmente presente nei campioni analizzati.

In tal senso, la Real Time PCR, o PCR quantitativa (qPCR) rappresenta un valido approccio sperimentale utile per ottenere informazioni qualitative e quantitative.

Scopo di questo studio, pertanto, è stato quello di mettere a punto una strategia di qPCR sensibile e specifica, utile non solo ad identificare ma anche quantificare la carica batterica di *S. Gallinarum* presente nei campioni sottoposti ad analisi.

## MATERIALI E METODI

### *Cepi batterici*

Per la sperimentazione è stato utilizzato un ceppo di *S. Gallinarum* isolato da un allevamento di galline ovaiole nel Sud Italia, identificato attraverso saggio biochimico mediante le strip API 20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia), e sierotipizzato in accordo con lo schema Kauffmann-Whyte (Popoff *et al.*, 2005). Come controlli negativi sono stati utilizzati *Escherichia coli* ATCC 25922, e due ceppi di *S. enterica*, *serr.* Enteritidis e Typhimurium precedentemente isolati e caratterizzati (Camarda *et al.*, 2013).

Tutti i ceppi sono stati rivitalizzati da glicerolo, coltivati su Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid, Milano) ed incubati nelle condizioni ottimali per ciascuno stipite.

### *Estrazione del DNA batterico*

L'estrazione del DNA batterico è stata effettuata a partire da colture pure, utilizzando il PureLink® Genomic DNA Kits (Life Technologies, Milano) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

Il DNA estratto è stato quantificato mediante misurazione della densità ottica a 260 nm mediante apparato Nanodrop (Thermo Scientific, Milano). A partire da ciascun ceppo sono stati allestiti sette campioni di DNA a concentrazione scalare, come riportato in Tab. 1.

**Tabella 1.** Concentrazione dei sette campioni determinata mediante misurazione dell'assorbanza a 260 nm.

Campione	Concentrazione (ng/μL)
A	1,66E+00
B	3,32E-01
C	6,63E-02
D	1,33E-02
E	2,65E-03
F	5,30E-04
G	1,06E-04

I campioni sono stati utilizzati per allestire tre differenti esperimenti di qPCR. In ogni ripetizione, ciascun campione è stato esaminato in triplicato al fine di verificare la riproducibilità, specificità e sensibilità del metodo.

### *Real Time PCR*

Gli oligonucleotidi da usare come primer sono stati disegnati per amplificare una porzione di una regione unica e non ripetuta nel genoma di *S. Gallinarum* (Thomson *et al.*, 2008), riconosciuta essere specifica e discriminante (Pugliese *et al.*, 2011), mediante software Primer3 (Untergrasser *et al.*, 2012).

Le sequenze dei primer forward (RTSGf) e reverse (RTSGr) sono rispettivamente: 5'-CCGATATGAGGGGATGTAC-3' [posizione sul genoma da 334859 a 334876] e 5'-AGGTCGTAATGAGTCAAA-3' [posizione sul genoma da 334985 a 335002].

La specificità delle sequenze è stata inizialmente testata *in silico* mediante Primer-BLAST (Ye, *et al.*, 2012).

Per garantire una maggiore specificità, come reporter è stata utilizzata una sonda interna all'amplificato.

La reazione è stata condotta in un volume finale di 10  $\mu$ L, con 1X SsoFast™ Probes Supermix with ROX (Biorad, Milano), 100 nM di ciascun primer (RTSGf e RTSGr) e 400 nM di sonda. A ciascun campione è stato aggiunto 1  $\mu$ L di campione di DNA. In ogni esperimento sono state allestite tre reazioni con acqua distillata da usare come bianco.

Tutte le reazioni sono state condotte su piattaforma ABI 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, Milano), con il seguente protocollo di amplificazione: una prima fase in cui i campioni sono stati sottoposti per 5 minuti a 95°C, ed in seguito a 45 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento a 55°C per 30 secondi, estensione 65°C per 45 secondi. L'acquisizione della fluorescenza è stata impostata durante la fase di estensione. I dati sono stati poi analizzati con il Sequence Detection Software versione 1.2.3 (Life Technologies). Il ciclo soglia (Ct) è stato impostato automaticamente.

Delle sette diluizioni quattro (A, B, D, F) sono state utilizzate come standard per la costruzione della retta di taratura, mentre le restanti tre (C, E, G) sono state identificate come campioni per poter verificare l'eventuale corrispondenza tra le concentrazioni ottenute con il protocollo di qPCR con quelle quantificate mediante misurazione della densità ottica.

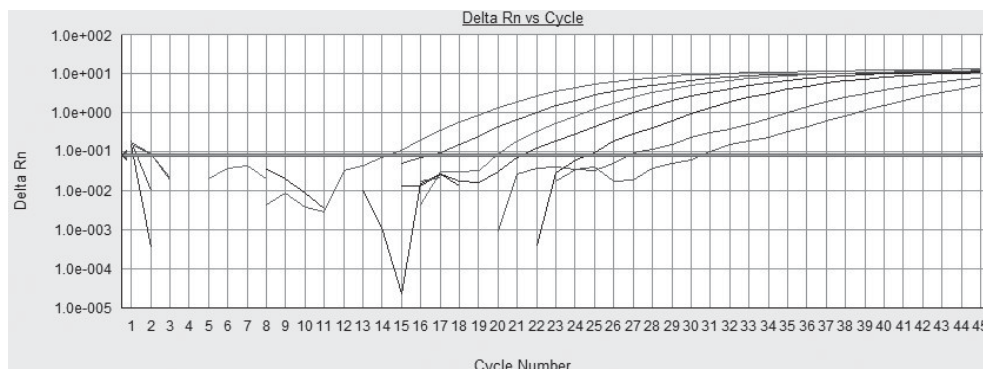
La retta di taratura è stata ricavata rapportando il Log10 della concentrazione contro il Ct di ogni campione, per le tre ripetizioni, attraverso interpolazione mediante metodo dei minimi quadrati, calcolando R<sup>2</sup> ed efficienza di amplificazione.

Il numero di copie di sequenze bersaglio è stato determinato, considerando che la regione amplificata è presente in singola copia nel genoma di *S. Gallinarum* e che la dimensione del cromosoma è di 4,658 Mpb, secondo l'equazione  $N = (m/M) * N_A$  (N=numero di copie; m=massa in g; M=massa molare del cromosoma; N<sub>A</sub>=Numero di Avogadro).

L'accuratezza è stata calcolata secondo l'equazione  $A = 100 - (C_q - C_a) / C_a * 100$  (A=accuratezza; C<sub>q</sub>=concentrazione misurata tramite qPCR; C<sub>a</sub>=concentrazione misurata attraverso l'assorbanza a 260nm).

## RISULTATI

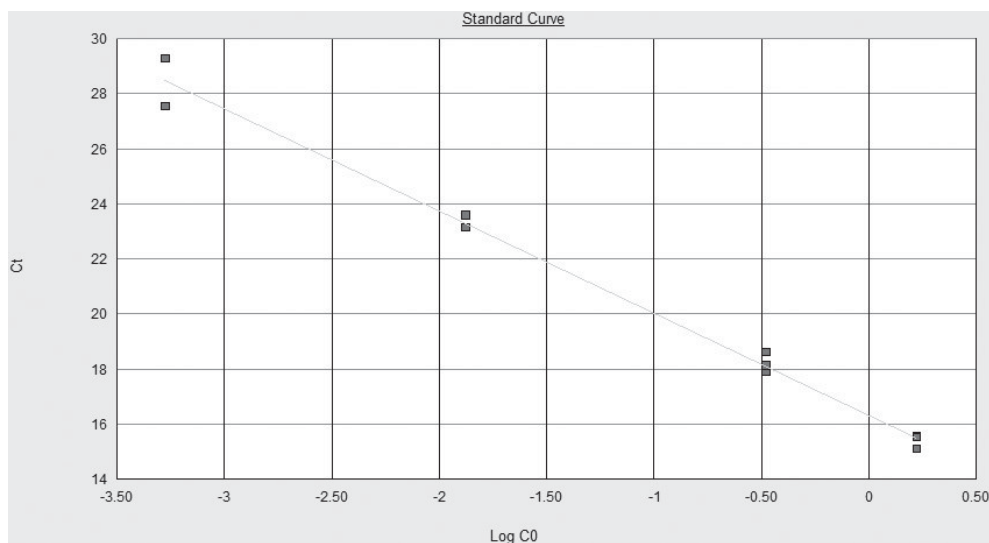
Le curve di amplificazione dei sette campioni di *S. Gallinarum* sono mostrate in Figura 1.



**Figura 1.** Diagramma di amplificazione dei campioni di *S. Gallinarum*.

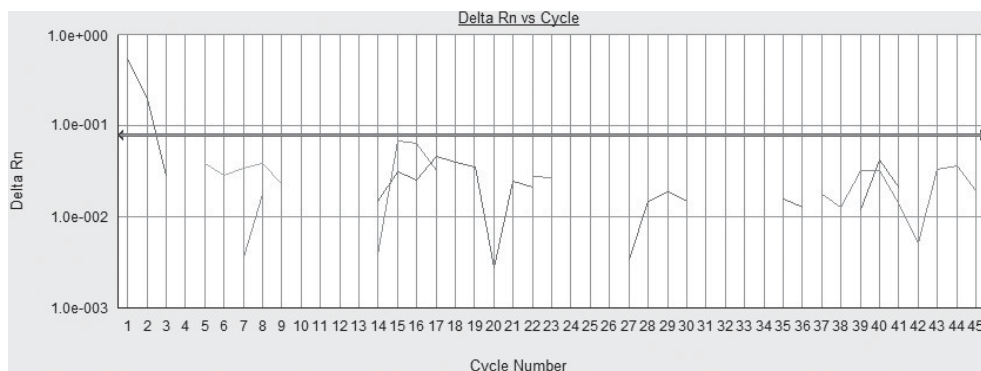
L'andamento delle curve è coerente con la concentrazione dei campioni. Si nota, infatti, che il ciclo soglia aumenta in maniera inversamente proporzionale con la concentrazione dei campioni.

La retta di taratura allestita con gli standard (Fig. 2) presenta un coefficiente angolare di -3,72 e coefficiente di correlazione  $R_2$  pari a 0,99. L'efficienza di amplificazione stimata è dell'85,7%.



**Figura 2.** Retta degli standard.

Al contrario, le qPCR allestite a partire da DNA di ceppi di *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* non evidenziano le curve di amplificazione (Fig. 3). L'analisi di specificità *in silico* non evidenzia altri potenziali amplificati tra le sequenze depositate in GenBank.



**Figura 3.** Diagramma di amplificazione del DNA di *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

La media delle quantità di DNA per ogni campione considerato come incognito, misurata mediante qPCR, sono riportati in Tab. 2. L'accuratezza risulta essere superiore al 98%.

**Tabella 2.** Concentrazioni e numero di copie dei campioni considerati come incogniti

Campione	Misurazione mediante assorbanza		Misurazione mediante qPCR		Accuratezza (% sul numero di copie)
	Concentrazione (g/mL)	Numero di copie <sup>1</sup> (Log <sub>10</sub> )	Concentrazione (g/mL)	Numero di copie <sup>1</sup> (Log <sub>10</sub> )	
C	6,63E-2	5,12	6,10E-2	5,08	99,3
E	2,65E-3	3,72	2,75E-3	3,74	99,6
G	1,06E-4	2,32	1,17E-4	2,37	98,1

<sup>1</sup>Calcolato sulla quantità di DNA in 1 mL

## DISCUSSIONE

Alla luce dei dati ottenuti, il protocollo di qPCR descritto risulta efficace e sensibile. Esso è, infatti, in grado di rilevare quantità di DNA almeno pari a  $10^{-4}$  ng, corrispondenti a circa 200 copie del genoma di *S. Gallinarum*. Inoltre, il protocollo risulta altamente specifico in quanto né *in silico*, né *in vitro* si ottengono amplificati aspecifici. In particolare, non si ottiene nessun amplificato da *E. coli* così come da altri serovar di *S. enterica*.

Inoltre, esso presenta ulteriori vantaggi. La possibilità di utilizzare una Ct automatica che garantisca un'elevata riproducibilità della quantificazione è un passaggio importante per una standardizzazione del metodo, in quanto non richiede una particolare elaborazione da parte dell'operatore nell'interpretazione dei dati, contribuendo all'oggettività dei dati.

Pertanto, la possibilità di disporre di un sistema oggettivo ed affidabile potrebbe consentirne l'utilizzo in ambito diagnostico, ma anche per altri scopi, tra cui il monitoraggio ambientale degli allevamenti, o per studi di trasmissibilità mediata da vettori.

Non va sottovalutato, infatti che la determinazione della carica batterica circolante può risultare particolarmente utile al fine di intervenire rapidamente per attivare misure profilattiche necessarie non solo per contenere la diffusione della malattia ma anche per evitarne l'insorgenza.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Shivaprasad HL. (2003). Pullorum Disease and Fowl Typhoid, In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson JR, Fadley AM, McDougald LR and Swayne DE (Eds.), *Diseases of Poultry, 11th edn.* Iowa State Press, Ames, IA, pp. 568–582.
2. OIE, 2010a. Criteria for Listing Diseases. In: OIE (World Organisation for Animal Health), Terrestrial animals health code, 19th ed., vol. I. OIE, Paris.
3. OIE, 2010b. Fowl typhoid and pullorum disease. In: OIE (World Organisation for Animal Health), Terrestrial animals health code, 19th ed., vol. II. OIE, Paris.
4. Popoff MY and Le Minor L. (1997). Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 7<sup>th</sup> revision. Pasteur Institute, Paris.
5. ISO 6579. (2002). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella*. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
6. Pugliese N, Circella E, Pazzani C, Pupillo A and Camarda A. (2011). Validation of a seminested PCR approach for rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum. *J. Microbiol Methods* 85, 22–27.
7. Popoff MY and Le Minor LE. (2005). Genus XXIII. *Salmonella* Lignères 1900, 389AL. In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg N.R and Staley JT (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, II ed., vol II The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria.* Springer, New York, pp. 764–799.
8. Camarda A, Pugliese N, Pupillo A, Oliva M, Circella E, Dionisi AM, Ricci A, Legretto M, Caroli A and Pazzani C. (2013). Resistance Genes, Phage Types and Pulsed Field Gel Electrophoresis Pulsotypes in *Salmonella enterica* Strains from Laying Hen Farms in Southern Italy. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 3347-3362.
9. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Sanders M, Whitehead S, Chabalgoity JA,



- Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G and Parkhill J. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18, 1624–1637.
10. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115.
  11. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S and Madden T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13:134.

# **RESPONSE TO ROAD TRANSPORTATION IN TURKEY (*MELEAGRIS GALLOPAVO*): THE ACUTE PHASE PROTEIN EXPRESSION IN LIVER AND ADIPOSE TISSUE.**

Marques A.T.<sup>1</sup>, Lecchi C.<sup>1</sup>, Grilli G.<sup>1</sup>, Giudice C.<sup>1</sup>, Restelli L.<sup>1</sup>, Rota Nodari S.<sup>2</sup>, Vinco L.J.<sup>2</sup>, Ceciliani F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Veterinary Science and Public Health, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy*

<sup>2</sup> *National Reference Centre of Animal Welfare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna B. Ubertini, Brescia, Italy*

## **Summary**

Road transportation is one of the most stressful events during the turkeys' lifetime and is associated with economic losses. Beside their use as biomarkers of inflammation, acute phase proteins (APP) have been also used as biomarkers of animal welfare, including stress due to transport, but no information is available in turkey species.

The aim of the present study was to evaluate whether the gene expression of four APP, namely  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP), C-Reactive Protein (CRP), Serum Amyloid A (SAA) and PIT54, as potential indicators of transport stress in turkey (*Meleagris gallopavo*), by qualitative and quantitative real time (qPCR) in liver and adipose tissue. Fourteen healthy animals were divided into two groups: a group subject to road transport and a control group not subject to road transport.

The expression of AGP and CRP mRNA was found to be increased in animals slaughtered after road transport. AGP mRNA expression was increased in both liver and adipose tissue, and identified as one of the major stress indicators. The presence of AGP protein in liver and adipose tissue was also confirmed by immunohistochemistry. CRP mRNA expression was found to be increased in liver alone. The results of this study suggest that AGP may serve as biomarker of stress to evaluate the transporting conditions in turkeys.

## **INTRODUCTION**

Animal welfare is of major concern in animal productions, in order to produce safe and quality food. Road transportation is an inevitable practice that animals encounter in the livestock industry and represents a critical phase in animal meat production (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012).

Recently, it has been suggested that acute phase proteins (APPs) may also represent useful indicators of animal welfare, such as stress caused by road transport (Giannetto et al., 2011; Pineiro et al., 2007), suggesting their potential use as a parameter to evaluate stress.

Although APPs are produced mainly in liver, they can be produced also in adipose tissue (Sauerwein et al., 2014). Adipose tissue is a loose connective tissue which, beside its role in regulating metabolism and homeostasis, is also related to innate immunity. Moreover, during a stressful condition, the activation of the sympatho-adrenal and hypothalamic-pituitary-adrenal axis leads in turn to the activation of adipose tissue

metabolism (Chrousos, 2000), thus making adipose tissue to extremely reactive and sensitive to stress.

While APPs have been studied in mammals, no information about APPs and its relationship with adipose tissue in poultry has been made available so far. In this study we investigated if road transport alters the gene expression of major APPs in liver and adipose tissue of turkey (*Meleagris gallopavo*), with the final aim to find markers of transport related stress.

## **MATERIAL AND METHODS**

### Samples collection

Liver and adipose tissue samples were obtained during routinely slaughtering procedures. A group of seven animals were slaughtered on farm (control group) and a group of seven animals were slaughtered after 2 hours-transportation (stressed animals). Portions of tissues were removed immediately after slaughtering and collected in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples for immunohistochemistry were fixed in 10% buffered formalin. Samples were collected during the routine slaughtering procedures.

### Primers design, RNA extraction and cDNA synthesis

Four APPs were selected (AGP, CRP, SAA and PIT54) based on previous studies on chicken. Three housekeeping genes were selected (GAPDH, RPL4 and YWHAZ) based on previous studies and literature. Total RNA was isolated from liver and adipose tissue using Trizol standard protocol (Invitrogen). RNA was treated with DNase (Fermentas) and the first-strand cDNA synthesis was carried out using iScript cDNA synthesis kit (BioRad).

### Qualitative and quantitative mRNA expression

The same primers were used in qualitative and quantitative PCR. Each sample was tested in duplicate. The thermal profile for qPCR was  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min,  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, 40 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 8s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 20s. Conditions for melting curve construction were  $95^{\circ}\text{C}$  for 5s, decreasing to  $55^{\circ}\text{C}$  for 5s and increasing to  $95^{\circ}\text{C}$  for 5s. Results were compared using the  $\Delta\text{-}\Delta\text{C}_q$  method.

### Western blot analysis

Samples for Western blot analysis were prepared from aliquots of 50–100 mg tissues. Aliquots with different concentrations were separated by 12% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and Western blotted onto nitrocellulose membrane. The membranes were immunolabelled for the presence of AGP using bovine AGP antibody and immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) using Immobilon Western Chemiluminescence substrate (Millipore). Bovine adipose tissue and AGP purified from bovine serum were used as positive controls.

### Immunohistochemistry studies

Sections of liver and adipose tissue were mounted on poly-lysine-coated slides. The

sections were deparaffinized in xylene, rehydrated with ethanol and the endogenous peroxidase activity was blocked with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol. Antigen retrieval was performed by heating the slides in a pressure cooker in citrate buffer solution. The nonspecific protein-binding was blocked with normal goat serum and the slides were incubated with the same primary antibody used for Western blot. The sections were treated with PolyView mouse/rabbit nanopolymer detection reagents (Enzo Life Sciences, Inc.), developed with the chromogen, 3-amino-9-ethylcarbazole (Vector Laboratories) and counterstained with Mayer hematoxylin.

## RESULTS

In this work, we have identified by mRNA expression analyses four major APPs—AGP, CRP, SAA and PIT54 produced in turkey livers. Adipose tissue can also produce a small quantity of these APPs in a non-stressed animal, which surprisingly increased after exposure to transport-related stress.

Quantitative PCR revealed that liver AGP and CRP mRNA increased with a statistical significance in animals slaughtered after road transport. On the contrary, the mRNA abundance of PIT54 and SAA did not show any statistically significant difference after road transportation.

Adipose tissue AGP mRNA increased with a statistical significance in animals slaughtered after road transport. Unlike liver, adipose tissue PIT54 seems to be more expressed during road transportation with a positive trend. CRP and SAA have shown a slight increase in transported animals but the results are not significant.

The second part of the experiment was focused on proteins. We demonstrated that bovine anti-AGP cross-reacted with the equivalent turkey protein. Immunohistochemistry was done to detect the precise AGP location in liver and adipose tissue. In adipose tissue sections, anti-AGP stained an elevated number of adipocytes. Immunostaining was localized at the periphery of adipocyte cytoplasm and lining cell borders. Liver also stained positively.

## DISCUSSION

The present study provides for the first time information on acute phase proteins in turkeys. We demonstrated that two-hours-long road transportation is able to modify APP mRNA expression in liver. In particular, AGP and CRP mRNA was overexpressed after road transportation stress. Remarkably, we found that adipose tissue was also reactive to road transportation, since AGP mRNA also increased in transported animals.

AGP seems to be the most relevant APP in turkey and the AGP protein presence was confirmed by Western Blot and immunohistochemistry. Western Blot electropherogram clearly identified in adipose tissue a 55-66 kDa band, with the same molecular weight of the corresponding bovine protein (Rahman et al., 2015).

Our hypothesis is supported by previous studies in other poultry species, which demonstrated that the measurement of AGP may provide useful information on both health and welfare in chickens (Salamano et al., 2010). The serum concentration of AGP was also significantly increased in organically produced broilers as

compared to conventionally produced ones (Tuytens et al., 2008).

Among the other APPs included in the present study, only liver CRP mRNA was shown to be upregulated (3.5-folds higher) in road transported animals. CRP is a major APP in humans and dogs and frequently used in veterinary field (Eckersall and Bell, 2010), but little evidence is available in poultry (O'Reilly and Eckersall, 2014). Neither PIT54 nor SAA liver mRNA abundance was modified after road transport.

The PIT54 is homologous to the scavenger receptor cysteine-rich family of proteins and has been identified as the major haemoglobin-binding protein, corresponding to mammalian haptoglobin, (Wicher and Fries, 2006). The present findings thus confirm in turkey that only adipose tissue PIT54 mRNA is overexpressed following transport.

SAA may be used as markers of stress in other species (Lomborg et al., 2008; Soler et al., 2013) but in the current study no statistical increase of SAA mRNA was observed, neither in liver nor in adipose tissue.

## CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated that APP expression is influenced by road transport and may be explored as a suitable biomarker of stress transport. We suggest that, on the background of mRNA abundance data, the concentration of AGP and CRP might be modified in turkey after transport by road and may provide useful clinical indicators of stress in poultry. We also demonstrated that adipose tissue is capable to mount a local acute phase response during this stress condition. The present results represent the first step to develop turkey specific assays.

## REFERENCES

- Chrousos, G.P., 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *International Journal of Obesity* 24, S50-S55.
- Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal* 185, 23-27.
- Giannetto, C., Fazio, F., Casella, S., Marafioti, S., Giudice, E., Piccione, G., 2011. Acute phase protein response during road transportation and lairage at a slaughterhouse in feedlot beef cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science* 73, 1531-1534.
- Lomborg, S.R., Nielsen, L.R., Heegaard, P.M.H., Jacobsen, S., 2008. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Veterinary Research Communications* 32, 575-582.
- O'Reilly, E.L., Eckersall, P.D., 2014. Acute phase proteins: a review of their function, behaviour and measurement in chickens. *World's Poultry Science Journal* 70, 27-43.
- Pineiro, M., Pineiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Lampreave, F., 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Veterinary Journal* 173, 669-674.

- Rahman, M.M., Lecchi, C., Sauerwein, H., Mielenz, M., Hausssler, S., Restelli, L., Giudice, C., Ceciliani, F., 2015. Expression of alpha1-acid glycoprotein and lipopolysaccharide binding protein in visceral and subcutaneous adipose tissue of dairy cattle. *Veterinary Journal* 203, 223-227.
- Salamano, G., Mellia, E., Tarantola, M., Gennero, M.S., Doglione, L., Schiavone, A., 2010. Acute phase proteins and heterophi:lymphocyte ratio in laying hens in different housing systems. *Veterinary Record* 167, 749-751.
- Sauerwein, H., Bendixen, E., Restelli, L., Ceciliani, F., 2014. The adipose tissue in farm animals: a proteomic approach. *Current protein & peptide science* 15, 146-155.
- Schwartzkopf-Genswein, K.S., Faucitano, L., Dadgar, S., Shand, P., González, L.A., Crowe, T.G., 2012. Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: a review. *Meat Science* 92, 227-243.
- Soler, L., Gutierrez, A., Escribano, D., Fuentes, M., Ceron, J.J., 2013. Response of salivary haptoglobin and serum amyloid A to social isolation and short road transport stress in pigs. *Research in Veterinary Science* 95, 298-302.
- Tuytens, F., Heyndrickx, M., De Boeck, M., Moreels, A., Van Nuffel, A., Van Poucke, E., Van Coillie, E., Van Dongen, S., Lens, L., 2008. Broiler chicken health, welfare and fluctuating asymmetry in organic versus conventional production systems. *Livestock Science* 113, 123-132.
- Wicher, K.B., Fries, E., 2006. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4168-4173.

# **ANALISI MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE NEGLI ANNI 2013 E 2014 . CONSIDERAZIONI SUI GENOTIPI CIRCOLANTI IN ITALIA E IN ALTRI PAESI EUROPEI ED EXTRA-EUROPEI.**

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

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

## **Summary**

Infectious bronchitis virus (IBV) is a coronavirus that causes upper respiratory, renal and/or reproductive diseases with high morbidity in poultry. Classification of IBV is important for implementation of vaccination strategies to control the disease in commercial poultry. Currently, the sequence analysis of the IBV S1 gene is considered the gold standard for IBV strain identification, with a high nucleotide identity ( e.g.  $\geq 95\%$ ) indicating related strains.

A study was carried out on 545 Infectious Bronchitis virus identified in Italy and European Countries and extra European Countries between 2013 and 2014. A portion of the S1 gene was amplified and sequenced in order to explore the genetic variability of the IBV strains circulating in the late two years. Genotypes QX-like, 793B, Q1 and M41 are prevalent in Italy.

Genotypes EG/CLEVB-2, 793B, QX-like and Q1 are prevalent in European and extra European Countries.

## **INTRODUZIONE**

Il virus della Bronchite Infettiva Aviaria (IBV) è un coronavirus, prototipo della famiglia Coronaviridae, pleomorfo, di 80-200 nm di diametro, con genoma RNA a singolo filamento e provvisto d'envelope. E' causa della bronchite infettiva aviaria, malattia altamente contagiosa, caratterizzata da sintomi e lesioni respiratorie, che in alcuni casi può interessare anche gli apparati gastrointestinale ed uro-genitale causando nefropatie con alta mortalità e/o problemi alla deposizione e alla qualità del guscio dell'uovo nelle galline ovaiole. Nel tracciare un quadro epidemiologico della Bronchite Infettiva si può notare come il coronavirus, responsabile della malattia, sia in continua evoluzione, si assiste infatti alla costante comparsa di nuove varianti con caratteristiche peculiari per virulenza, tropismo o patogenesi. Nel corso degli anni sono state innumerevoli le varianti isolate in campo, differenti fra loro dal punto di vista sierologico, genotipico e patogenetico. Alcuni sierotipi, come i ceppi Massachusetts (Mass) ed il 793/B sono stati identificati in molti paesi, ma la maggioranza dei sierotipi sono endemici di ristrette regioni geografiche. Negli ultimi 20 anni nuovi sierotipi di IBV sono stati identificati negli Stati Uniti, in Europa, Cina, Taiwan, Giappone, Colombia, India ed altri paesi. Il sierotipo Massachusetts della BI è stato isolato



per la prima volta in Europa negli anni '40 (Cavanagh & Davis, 1993) mentre Petek, Paparella & Catelani, e Galassi descrissero contemporaneamente la BI per la prima volta in Italia nel 1956. L'andamento della malattia nel nostro paese, riguardo la prevalenza e la gravità, è stato fluttuante negli anni. Alla virosi primaria respiratoria inizialmente osservata, a partire dagli anni '60 si aggiunse la sindrome "nefrite/nefrosi" dovuta a ceppi nefropatogeni (Pascucci et al., 1990). A questo periodo risale infatti la prima segnalazione di un nuovo sierotipo in Italia: il ceppo nefropatogeno 1731PV (Rinaldi et al., 1966). Durante gli anni '70 la BI si è andata gradualmente attenuando, Zanella segnalava in quegli anni la notevole diffusione del ceppo nefropatogeno AZ23/74 (Zanella, 1976). All'inizio degli anni '80 si assiste invece ad una sensibile ripresa della malattia e durante tutto il decennio si sono moltiplicati gli isolamenti di ceppi differenti, tra i quali il 3794/Fo/83 (Pascucci et al., 1986a) associato a gravi forme respiratorie, ed utilizzato anche nei prodotti vaccinali. Negli anni '80 sono state isolate con una certa frequenza le varianti tipizzate in Olanda: il ceppo D207 (anche conosciuto come D274) ed il D212 (meglio conosciuto come D1466). In particolare, il sierotipo D274 risultava essere anche il più diffuso in alcuni paesi dell'Europa occidentale all'inizio e alla metà degli anni '80 (Cook, 1984; Develaar et al., 1984). Il genotipo 793/B fu identificato per la prima volta in Inghilterra nel 1990/91 (Gough et al., 1992; Parsons et al., 1992), ma la sua presenza è stata retrospettivamente dimostrata in Francia a partire dal 1985 (Cavanagh et al., 1998), mentre nei primi anni '90 fu isolato anche in Messico e Thailandia (Cook et al., 1996). Il sierotipo 624/I fu inizialmente descritto nel 1993 associato a forma respiratoria nel broiler (Capua et al., 1994), la successiva caratterizzazione molecolare ha confermato che si trattava di un nuovo genotipo (Capua et al., 1999). Il genotipo QX per la prima volta descritto in Cina nel 1995, è stato segnalato in Europa a partire dal 2002 ed in Italia a partire dal 2005 associato a gravi forme da nefrite nefrosi in pollastre e broilers. Negli anni 2004-2005 Landman e collaboratori hanno descritto per la prima volta il fenomeno delle "false ovaiole" in riproduttori e ovaiole da consumo di diverse linee genetiche. Tale fenomeno è stato messo in correlazione ad una pregressa infezione con forma nefropatogena da IBV con genotipo sovrapponibile al QX cinese, verificatasi nelle prime due settimane di vita degli animali. Nel 2011 (Toffan et al.) è stata segnalata la presenza del genotipo Q1 sul nostro territorio nazionale e per la prima volta in Europa. Il virus è stato isolato da un allevamento di broiler affetti da scarso accrescimento. Infine nel 2013 (Massi) è stata segnalata la presenza del genotipo CK/CH/Guangdong/Xindadi in galline ovaiole del Nord Italia. La circolazione dello stesso genotipo è stata confermata nel 2014 da Moreno et al. Le problematiche legate al controllo della bronchite infettiva, dovute principalmente alla notevole variabilità antigenica dell'IBV ed alla bassa cross-protezione tra sierotipi differenti, rendono necessario il costante monitoraggio dei ceppi circolanti sul territorio nazionale in modo da poter improntare misure efficaci di profilassi. Conseguentemente, l'isolamento e la tipizzazione dei ceppi di IBV risultano di fondamentale importanza non solo per lo studio

dell'evoluzione virale ma anche per l'adattamento dei programmi vaccinali ai ceppi effettivamente circolanti.

Questo lavoro si prefigge di ottenere una visione globale della complessa situazione epidemiologica dell'IBV sul territorio nazionale e in Paesi limitrofi. A questo scopo sono stati caratterizzati mediante metodi molecolari i ceppi di IBV provenienti da differenti Regioni geografiche e tipologie di allevamento, allo scopo di monitorare i ceppi attualmente circolanti ed evidenziare eventuali genotipi nuovi e/o emergenti in Italia e Paesi limitrofi.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Lo studio si riferisce a campioni conferiti presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I campioni erano primariamente di origine italiana e secondariamente provenivano da Paesi europei (Francia, Germania, Romania) ed extraeuropei (Giordania, Libano, Marocco, Federazione Russa, Arabia Saudita, Camerun, Algeria, Egitto, Albania, Ucraina, Tunisia, Bielorussia, Sud-Saharian Countries, Emirati Arabi Riuniti).

I campioni conferiti comprendevano animali vivi con segni clinici respiratori o con problemi di ovodeposizione, animali deceduti, visceri, tamponi tracheali.

In particolare, sono stati inclusi nell'analisi:

- tamponi tracheali conferiti presso la sezione con richiesta di ricerca di IBV
- campioni di organo (trachea, rene, tonsille cecali, ovaio, ovidutto) prelevati in sede autoptica da soggetti in cui vi fosse sospetto di bronchite infettiva
- campioni di organi di animali sottoposti a monitoraggio di controllo per sindromi respiratorie senza specifici sospetti diagnostici.
- FTA cards

In fase di accettazione sono state raccolte informazioni sullo stato sanitario del gruppo di animali ed il piano vaccinale eventualmente effettuato nell'allevamento di provenienza.

### *Caratterizzazione molecolare di IBV*

La ricerca del virus IBV è stata condotta mediante RT-PCR. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit di estrazione RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. L'RNA così estratto è stato sottoposto a reazione di RT-PCR:

- Reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-; tabella 2), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (Cavanagh et al., 1999) del virus. In particolare, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®), in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 600nM di ogni primer 5µl di 5X Onestep RT-PCR Buffer, 0.4nM di ogni dNTP, 12.5U di inibitori delle Rnasi, 1µl di OneStep RT-PCR enzyme mix e 5µl di estratto di RNA. Profilo di amplificazione: 1 X (50°C, 30 min), 1 X (94°C, 15 min), 40 X (94°C, 30 sec; 55°C, 30sec, 72°C, 40 sec), 1 X (72°C, 10 min)

### *Sequenziamento ed analisi della variabilità genetica*

Le reazioni di sequenza sono state approntate a partire dal prodotto PCR, previa purificazione su gel (Qiaquick Gel extraction kit – QIAGEN®) con il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem®) secondo le istruzioni del produttore. Le sequenze sono state effettuate in entrambe le direzioni impiegando gli stessi primers utilizzati nell'amplificazione. Le reazioni di sequenza sono state sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga3500xl (Applied Biosystems®). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v10.0 (DNASTAR Inc., Madison®, WI, USA).

L'analisi della variabilità genetica è stata effettuata comparando la sequenza dei ceppi in esame con le sequenze di genotipi di riferimento e di ceppi varianti circolanti attualmente: 624/I (JQ901492), 3794/83 FO; AZ23/74;; D274 (X15832); 793B (AF093794); H120 (M21970); M41 (AY561712); PA/1220/ (AY789942); Q1 (AF286302); QX (AF193423); CK/CH/Guangdong/Xindadi (AN: GU938442.1) utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011)

## **RISULTATI**

### **ANNI 2013/2014**

Nel corso degli ultimi due anni sono stati analizzati 1.136 campioni per la ricerca di IBV; di questi 545 (47,9%) sono risultati positivi e sottoposti a sequenziamento.

Nella tabella 1 sono riassunte le identificazioni molecolari effettuate, suddivise per genotipo e per numero. Sono stati identificati 8 differenti genotipi circolanti sul territorio nazionale (793B, QX, Q1, Massachusetts, D274, B1648, 1466 e CK/CH/Guangdong//Xindadi) e 10 differenti genotipi nei Paesi esteri limitrofi. ( 793B, QX, Q1, Massachusetts, CK/CH/Guangdong/Xindadi, 1494, EG/CLEVB-2, SUL/01/09, VARIANT2ISRAEL01 E NGA/293/2006). Dall'analisi di sequenza sono risultati 162 ceppi allineati a ceppi vaccinali.

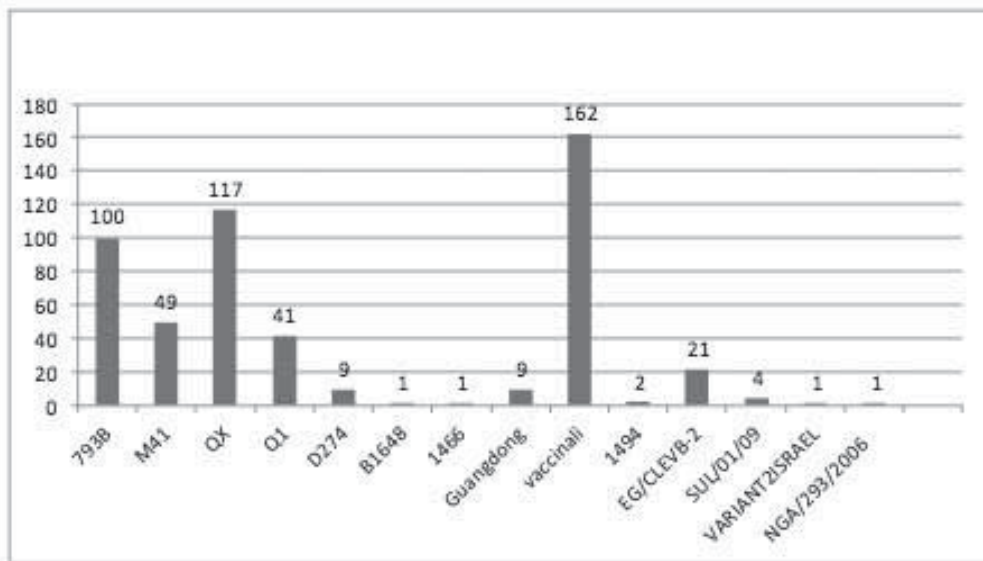
Nonostante il tentativo di raccogliere tutte informazioni reperibili riguardo lo stato vaccinale degli animali analizzati, in molti casi i dati ottenuti non sono risultati completi. A questo proposito, siccome il metodo molecolare utilizzato non è sempre in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo, i dati sono stati rielaborati escludendo dall'analisi tutti i ceppi che mostravano una identità di sequenza del 100% con i ceppi vaccinali più utilizzati (4/91, IB88, H120, 1/96, D274). Bisogna però ricordare che le percentuali di identificazione così rielaborate possono essere considerate solamente una stima, in quanto il ceppo vaccinale ed il ceppo di campo 793B non differiscono affatto nella regione sequenziata.

Da tale rielaborazione sono stati identificati 162 ceppi vaccinali.

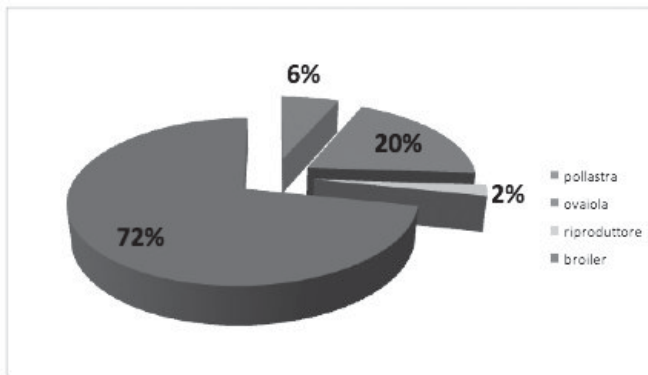
**Tabella 1.** Identificazione molecolare dei ceppi di IBV inclusi nell'analisi.

GENOTIPI	N°ISOLATI
793B	100
M41	49
QX-like	117
Q1	41
D274	9
B1648	1
1466	1
CK/CH/Guangdong/Xindadi	8
1494	2
EG/CLEVB-2	21
SUL/01/09	4
VIARANT2ISRAEL01	1
NGA/293/2006	1
Ceppi vaccinali	162

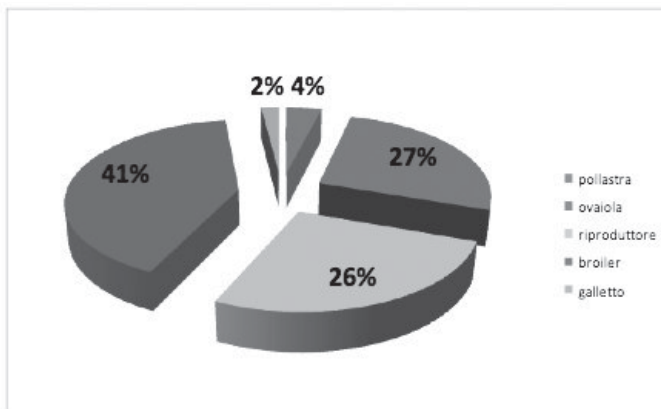
**Grafico n.1:** Analisi della variabilità genetica. Distribuzione dei genotipi di IBV rilevati mediante il sequenziamento di 545 ceppi.



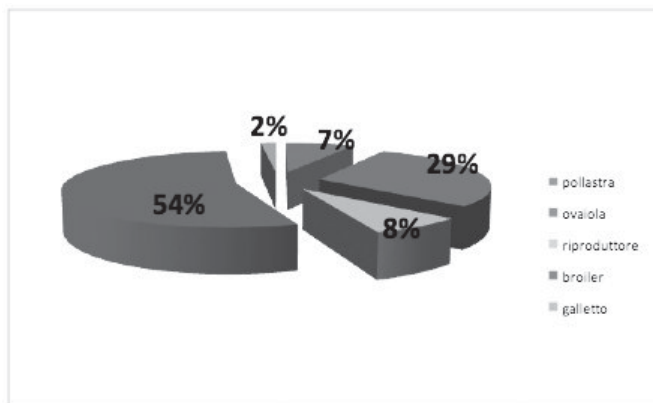
**Grafico n.2 Distribuzione del ceppo M41 nelle diverse specie produttive**



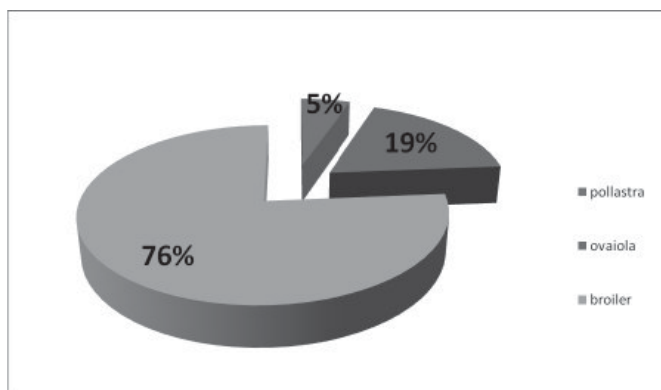
**Grafico n.3: Distribuzione del ceppo 793B nelle diverse specie produttive**



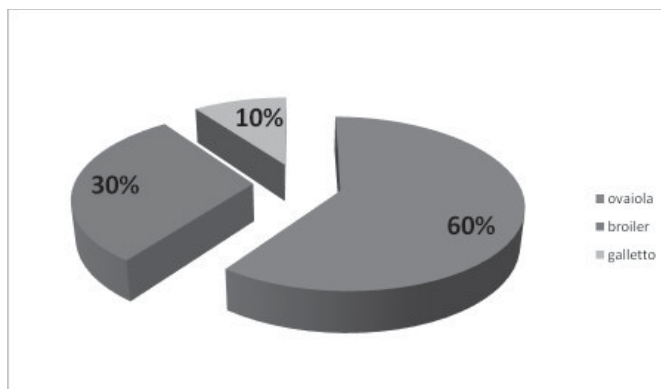
**Grafico n.4: Distribuzione del ceppo QX nelle diverse specie produttive**



**Grafico n.5: Distribuzione del ceppo Q1 nelle diverse specie produttive**



**Grafico n.6: Distribuzione del ceppo Ck/CH/Guangdong/Xindadi nelle diverse specie produttive**



## **DISCUSSIONE**

I dati raccolti in questo lavoro riguardano i ceppi di IBV isolati negli anni 2013 e 2014 da campioni provenienti dal territorio nazionale e Paesi esteri. In particolare, i ceppi isolati provengono da 14 diverse Regioni italiane. In realtà, la maggioranza dei ceppi analizzati provengono dalle Regioni settentrionali (59%). Considerando però che oltre il 70% della produzione di carni avicole e di uova è concentrata in tre regioni del Nord Italia (Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna) è possibile considerare questa indagine come rappresentativa della situazione nazionale nel suo complesso.

La caratterizzazione molecolare ha permesso di rilevare 8 genotipi differenti circolanti sul territorio nazionale con percentuali variabili: 30,6% per il genotipo 793B, 35,8% per il genotipo QX-like, 15% per il genotipo Massachusetts, 12,5% per il genotipo Q1, 2,7% per il genotipo D274, 0,3% per il genotipo B1648, 0,3% per

il genotipo 1466 ed il 2,5% per il genotipo CH/CK/Guangdong/Xindadii. In accordo con quanto riportato precedentemente (Moreno et al., 2007; Tosi et al., 2010; Taddei et al., 2011), il genotipo 793B resta un genotipo ad alta diffusione. Bisogna però considerare che il metodo di analisi utilizzato non è in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo e conseguentemente, la percentuale riportata potrebbe essere una sovrastima dovuta all'inclusione nell'analisi di ceppi vaccinali attenuati vivi, largamente utilizzati nell'allevamento avicolo.

Il genotipo QX, segnalato in Europa a partire dal 2002 (Bochkov et al., 2006) e in Italia a partire dal 2005 (Beato et al., 2005), risulta essere, il genotipo a maggiore diffusione, mentre il genotipo Massachusetts, molto diffuso in tutta Europa (Worthington et al., 2008) è stato identificato nel 12,5% degli isolati analizzati, presentando una circolazione costante negli ultimi anni.

Il genotipo It02, isolato per la prima volta in Italia nel 1999 (Bochkov et al., 2007), nel corso dell'ultimo decennio era arrivato a notevole diffusione (30.5% tra il 2005 ed il 2007) (Moreno et al., 2007), non è stato rilevato nel corso degli ultimi due anni confermando una netta diminuzione della circolazione di questo genotipo già negli anni precedenti.

Il genotipo 624/I, diffuso in Italia tra gli anni '60 e '90, aveva drasticamente diminuito la sua diffusione fino all'ultima registrazione risalente al 2004 (Moreno et al., 2007) per ricomparire nel 2010, 2011 e 2012. Dall'indagine degli ultimi due anni tale genotipo non è stato riscontrato. Nel nostro lavoro, la diffusione del genotipo Q1, identificato per la prima volta in Italia nord-orientale nel 2011 appare in netto aumento di diffusione. Sulla base dei dati raccolti il genotipo risulta essere attualmente diffuso nell'intero territorio nazionale essendo stato isolato anche in regioni centro-meridionali (Calabria, Lazio e Marche). Il genotipo Q1, descritto per la prima volta nel 2001 in Cina, isolato da ovaiole con lesioni da proventriculite (Yu et al., 2001) mostra una notevole identità di sequenza nel gene S1 con il genotipo 624/I e con la variante 3794/1983 conosciuta come ceppo "Fornino" ed ampiamente utilizzata durante gli anni '80 nei prodotti vaccinali.

Il genotipo D274, molto diffuso negli anni '80 e all'inizio degli anni '90 in molti paesi dell'Europa occidentale e nei Paesi Bassi, era stato isolato in Italia in maniera episodica tra il 2009 ed il 2010 (0.5%), ed il suo rilevamento sporadico è confermato nel corso del 2013 e 2014.. Sono comparsi in maniera sporadica anche i genotipi B1648 e 1466.

Infine si assiste ad un incremento percentuale della presenza del genotipo CK/CH/Guangdong/Xindadii (2,5%).

La caratterizzazione genetica dei ceppi pervenuti da Paesi esteri ha permesso di mettere in evidenza la circolazione di 13 genotipi diversi. Fra questi la maggior prevalenza è data dai genotipi: EG/CLEVB-2 con il 25,9%, 793B con il 24,6%, QX-like con il 15,5%, Q1 con il 14,2% e a seguire tutti gli altri genotipi con prevalenze comprese fra il 5 e l'1%.

## **CONCLUSIONI**

Sulla base dei dati raccolti nel corso del 2013-2014 la diffusione dei genotipi di IBV nel territorio nazionale appare diversificata. Sono stati identificati 8 diversi



genotipi circolanti: 793B, QX, Massachusetts, Q1, D274, B1648, 1466 e CK/CH/Guangdong/Xindadii. Il genotipo QX risulta essere quello maggiormente diffuso. Il genotipo 793B si conferma ampiamente diffuso rimanendo il secondo in ordine di diffusione, seguito dai genotipi Massachusetts e Q1. Di quest'ultimo va rilevata una progressiva diffusione nelle diverse specie allevate. I genotipi D274, B1648 e 1466 compaiono invece più sporadicamente.

Nei primi mesi del 2013 si assiste alla comparsa del nuovo genotipo CK/CH/Guangdong/Xindadii che poi, anche se sporadicamente, si è diffuso su scala nazionale.

Per quanto attiene ai genotipi circolanti nei Paesi Esteri si assiste ad una circolazione di una vasta gamma di genotipi, alcuni dei quali ( EG/CLEVB-2, SUL/01/09, VARIANT2 ISRAEL01) non circolanti nel territorio italiano.

Sarà interessante continuare a monitorare la diffusione del virus Bronchite al fine di stabilire se altri genotipi (es.il CK/CH/Guangdong/Xindadi) possano diffondersi con la stessa velocità dei ceppi QX e Q1.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Beato M.S., De Battisti C., Terregino C., Drago A., Capua I., Ortali G., (2005). Evidence of circulation of a chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *The Veterinary Record* 156:720.
2. Bochkov Y.A., Tosi G., Massi P., and Drygin V. (2007). Phylogenetic analysis of partial S1 and N genes sequences of infectious bronchitis viruses isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Vir gen.* 35:65-71.
3. Bochkov Y.A., Batchenko G.V., Scherbakova L.O., Borisov A.V., Drygin V.V., 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathology* 35:379-393.
4. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J., 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 28:593-605.
5. Jackwood M.W., Yousef N.M.H., Hilt D.A., (1997). Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 41:105-110.
6. Massi P. (2013). Situazione epidemiologica della Bronchite Infettiva in Italia. *Atti della Giornata di Studio: "Ritorno al futuro. La Bronchite Infettiva: patologia antica, nuovi patogeni"*. Bologna 2 ottobre 2013. *Atti Congressuali –Rivista di Medicina Veterinaria Speciale* 2013.
7. Moreno A., Fallacara F., Tosi G., and Massi P. (2007). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della bronchite infettiva aviaria isolati in Italia tra il 2005-2007. *Atti II Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria, ISTISAN congressi, Bologna 7-8 Giugno 2007.* –p 55.
8. Moreno A., Ceruti R., Boniotti B., Gavazzi L. Fasoli P., Cordioli P.(2014) Circolazione di un nuovo genotipo di virus della Bronchite Infettiva a viare in Italia. *Atti del Congresso Sipa.Salsomaggiore Terme,8-9 maggio 2014.*pp 177-181.

9. Taddei R., Tosi G., Barbieri I., Fiorenti L., Massi P., Boniotti B. (2011). Caratterizzazione molecolare dei ceppi del virus della bronchite infettiva aviare in Italia: aggiornamento dei dati raccolti nel corso dell'anno 2010. Atti del L Congresso nazionale SIPA. Forlì 7-8 aprile 2011. pp189-196.
10. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
11. Toffan A, Terregino C, Mazzacan E, Castaldello I, Capua I, Bonci M. (2011). Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Vet Rec.*;169(8):212-3.
12. Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Fiorentini L., Massi P. (2010). Caratterizzazione molecolare dei ceppi di virus della Bronchite Infettiva aviare isolati in Italia nel periodo 2007-2009 e nel primo bimestre del 2010. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA) 2010:XLIX Convegno annuale Forlì 29-30 Aprile 2010. pag. 217-224.
13. Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC.(2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol. Jun*;37(3):247-57.

# CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPPO *MILD* DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK EVIDENZIATO IN POLLI RURALI CON FORMA NERVOSA

Mescolini G.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Laconi A.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – ITALIA

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), ITALIA

## Summary

Marek's disease is an important lymphoproliferative disease of chickens caused by Gallid herpesvirus 2, which is commonly referred to as Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1). This virus induces a range of pathological conditions including central and peripheral nervous system signs and, most frequently, visceral lymphomas.

There are very few data on the molecular characteristics and epidemiology of MDV-1 in Italy, both in commercial and in backyard chickens. For that reason feathers and organs were collected from Cochin chickens from a rural context affected by a Marek's disease classical nervous form. The MDV-1 strain detected by PCRs was sequenced and compared to a MDV-1 strain detected from broilers breeders affected by visceral lymphomas.

The number of PPPP motif repetitions found in the transactivation domain of the Meq protein, indicated that the virus detected in Cochin chickens was *mild* MDV-1, while the one detected in commercial poultry was *very virulent* or *very virulent plus* MDV-1. Clinical, macroscopic and microscopic findings supported the molecular results.

## INTRODUZIONE

La malattia di Marek è un'importante malattia linfoproliferativa del pollo a diffusione mondiale causata da un *alphaherpesvirus* del genere *Mardivirus*, denominato *Gallid Herpesvirus 2* o, più comunemente, sierotipo 1 del virus della malattia di Marek (MDV-1). Questo virus è oncogeno e linfotropo, e può indurre varie forme patologiche fra cui le più comuni sono quelle neoplastica e nervosa. MDV-1 riconosce diversi patotipi virali denominati *mild*, *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus* (Schat e Nair, 2008).

La malattia è ancora oggi presente in Italia nonostante la vaccinazione sia applicata di routine su larga scala e recentemente sono stati descritti diversi focolai in allevamenti di riproduttori pesanti e di galline ovaiole (Piccirillo, 2011; Camarda e di Pineto, 2012). E' anche noto che la malattia è presente nell'allevamento rurale dove, di norma, non è attuata la vaccinazione.

Dati sulle caratteristiche molecolari dei ceppi virali circolanti in Italia, sia nel settore industriale sia in quello rurale, sono però attualmente assenti.

Nel presente lavoro sono stati caratterizzati due ceppi di MDV-1: il primo iso-

lato da polli rurali di razza ornamentale Cocincina affetti da malattia di Marek in forma nervosa, il secondo da riproduttori pesanti con forme neoplastiche viscerali. Nei polli rurali è stato anche eseguito esame clinico, necroscopico ed istopatologico. I virus sono stati evidenziati mediante diversi protocolli di PCR da penne e/o organi ed, al fine della caratterizzazione molecolare degli isolati, i prodotti di amplificazione del gene *meq* sono stati sequenziati e sottoposti ad analisi filogenetica.

## **MATERIALI E METODI**

### *Animali e Campionamento*

Due polli di razza Cocincina nana riccia, provenienti da un allevamento rurale multi-specie situato a Sarsina (FC) sono stati conferiti per diagnosi all'unità di Patologia Aviaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

I soggetti, nati in allevamento, al momento della comparsa della sintomatologia avevano circa due mesi. Su entrambi gli animali (accettati con numero 419/14 e 420/14) è stato eseguito l'esame clinico e, dopo soppressione, l'esame necroscopico. Dal soggetto 419/14 sono stati prelevati per PCR per MDV-1: fegato, polmone, rene, stomaco ghiandolare e penne. Da entrambi i soggetti sono stati prelevati per esame istopatologico: fegato, polmone, rene, stomaco ghiandolare, borsa di Fabrizio, plesso brachiale, plesso lombosacrale e nervo sciatico.

Il campione da allevamento intensivo di riproduttori pesanti (linea commerciale Ross 308), consisteva in un pool di penne prelevate da soggetti morti all'età di 23 settimane, che all'esame necroscopico mostravano linfomi epatici e splenici. Il pool di penne è stato sottoposto a PCR per MDV-1 con numero di accettazione 456/15.

### *Esame istopatologico*

Porzioni degli organi (escluse le penne) sono state fissate in formalina tamponata al 10 %, quindi incluse in paraffina, sezionate al microtomo (5 micron) e colorate con Ematossilina ed Eosina. Le sezioni colorate sono state osservate al microscopio ottico (Nikon Leica, Nikon Corporation, Japan).

### *Estrazione del DNA e PCR*

L'estrazione del DNA è stata eseguita da penne e da surnatante di omogenato di organi con il kit del commercio "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche) seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice, con opportune modifiche.

### *PCR sul Gene pp38*

La PCR sul gene che codifica per la proteina fosforilata pp38, è stata eseguita

secondo il protocollo riportato da Dunn *et al.* (2010) (*primer forward* pp38F: 5'-GTG ATG GGA AGG CGA TAG AA-3'; *primer reverse* pp38R: 5'-TCC GCA TAT GTT CCT CCT TC-3'). Il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese di 225 pb è stato visualizzato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, mediante colorazione con Bromuro di Etidio.

#### *PCR sul Gene ULI*

La PCR sul gene *ULI*, che codifica per la glicoproteina L, è stata eseguita secondo il protocollo riportato da Hassanin *et al.* (2013) (*primer forward* gL-F: 5'-ATG AAA ATT TAT AGA GTA CTC GTG-3'; *primer reverse* gL-R: 5'-GGC ATT GGC TCG TCG GCT-3'). Il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese di 588 pb è stato visualizzato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, mediante colorazione con Bromuro di Etidio.

#### *PCR sul Gene meq*

La PCR sul gene *meq* è stata eseguita secondo il protocollo riportato da Hassanin *et al.* (2013) (*primer forward* *meq*-F: 5'-ATG TCT CAG GAG CCA GAG CCG-3'; *primer reverse* *meq*-R: 5'-GGG TCT CCC GTC ACC TGG-3'). Questi oligonucleotidi amplificano una sequenza di 1020 pb, corrispondente all'intero gene *meq*; tuttavia nei diversi patotipi di MDV-1 sono presenti diverse isoforme del gene, a lunghezza variabile. Il prodotto di amplificazione è stato visualizzato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1%, mediante colorazione con Bromuro di Etidio.

#### *Sequenziamento ed analisi filogenetica*

I prodotti di amplificazione del gene *meq* sono stati sequenziati, in entrambe le direzioni, presso il centro di sequenziamento MacroGen Europe (Amsterdam). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit, allineate e confrontate, utilizzando il software Clustal W, alle sequenze del gene *meq* di ceppi MDV-1 di riferimento (compresi i ceppi vaccinali) presenti in *GenBank* (tabella I). L'analisi filogenetica è stata realizzata utilizzando l'algoritmo Neighbor-Joining col software MEGA6. Sono stati considerati attendibili solo i nodi dell'albero filogenetico con valori di bootstrap (calcolati su 1000 replicati) pari o maggiori di 70.

**Tabella I.** Ceppi MDV-1 di riferimento depositati in *GenBank* inclusi nell'analisi di sequenza.

<b>ISOLATO</b>	<b>PAESE D'O-RIGINE</b>	<b>PATOTIPO</b>	<b>N° ACCESSO DEL GENE <i>MEQ</i> (GenBank)</b>
<b>MPF57</b>	Australia	vMDV	EF523774.1
<b>04CRE</b>	Australia	vMDV	EF523773.1
<b>02LAR</b>	Australia	vvMDV	EF523772.1
<b>FT158</b>	Australia	vvMDV	EF523771.1
<b>CVI988/ Rispens(Intervet)</b>	Olanda	attMDV	DQ534538.1
<b>CU-2</b>	USA	mMDV	AY362708.1
<b>BC-1</b>	USA	vMDV	AY362707.1
<b>GA</b>	USA	vMDV	M89471.1
<b>GX060167</b>	China	-	EU697887.1
<b>JM102</b>	USA	vMDV	HM488348.1
<b>RB1B</b>	USA	vvMDV	AY243332.1
<b>RL</b>	USA	vv+MDV	AY362720.1
<b>TK</b>	USA	vv+MDV	AY362721.1
<b>N</b>	USA	vv+MDV	AY362718.1
<b>New</b>	USA	vv+MDV	AY362719.1
<b>U</b>	USA	vv+MDV	AY362722.1
<b>W</b>	USA	vv+MDV	AY362723.1
<b>X</b>	USA	vv+MDV	AY362724.1
<b>549</b>	USA	vvMDV	AY362714.1
<b>567</b>	USA	vMDV	AY362709.1
<b>571</b>	USA	vMDV	AY362710.1
<b>595</b>	USA	vvMDV	AY362715.1
<b>648A</b>	USA	vv+MDV	AY362725.1
<b>686</b>	USA	vv+MDV	AY362727.1
<b>3004</b>	Russia	attMDV	EU032468.1
<b>Lmeq</b>	Cina	-	DQ453117.1
<b>6_12</b>	Polonia	-	KJ464837.1
<b>56_12</b>	Polonia	-	KJ464839.1
<b>122_11</b>	Polonia	-	KJ464835.1
<b>121_11</b>	Polonia	-	KJ464834.1
<b>116_11</b>	Polonia	-	KJ464833.1
<b>108_11</b>	Polonia	-	KJ464831.1

## RISULTATI

### *Esame clinico ed anatomo-istopatologico*

All'esame clinico i polli provenienti dall'allevamento rurale (419/14 e 420/14) mostravano difficoltà o incapacità di mantenere la stazione eretta, con atteggiamento a "spaccata", con dita chiuse a pugno o in decubito laterale con paralisi spastica agli arti (Figura 1). All'esame necroscopico era possibile osservare lesioni anatomopatologiche a carico dei plessi nervosi e dei nervi periferici (Figura 2), con interessamento dei plessi brachiale e lombosacrale, dei nervi brachiale, sciatico, intercostali e vago. I nervi avevano perso il normale aspetto bianco-lucente e presentavano un colorito giallastro. A un'osservazione attenta era evidente la perdita della tipica zigrinatura trasversale. In nessuna sede si evidenziavano lesioni a carattere neoplastico.



**Figura1.** Pollo rurale in decubito laterale con paralisi spastica degli arti (419/15)

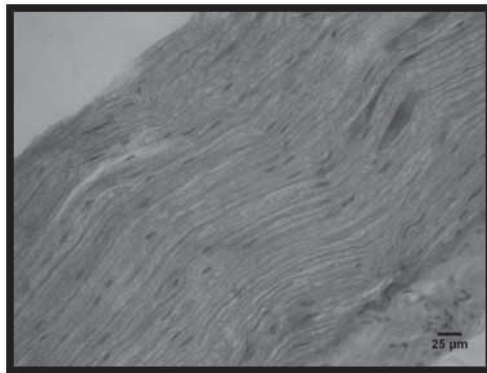


**Figura 2.** Aumento di volume bilaterale del plessi e dei nervi brachiali, dei plessi lombo-sacrali e dei nervi sciatici (419/14).

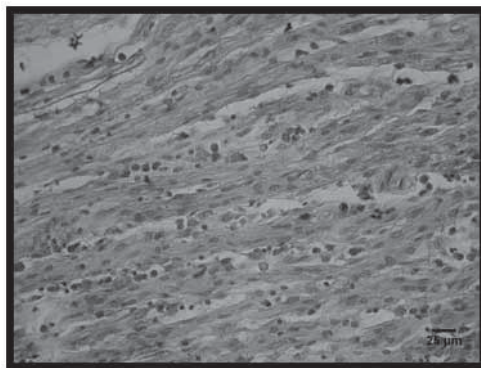


Alterazioni istopatologiche erano presenti solo a carico dei nervi. L'aspetto istologico dei nervi si discostava dalla normalità (Figura 3). Si evidenziava presenza d'infiltrato di natura linfoide ed edema. Le lesioni erano classificabili nelle lesioni di tipo A e B, secondo quanto riportato da Payne e Biggs (1967). Le lesioni di tipo B o infiammatorie, erano caratterizzate da edema interneuritico ed infiltrato diffuso di piccoli, medi, grandi linfociti e plasmacellule (Figura 4); mentre quelle di tipo A o proliferative da infiltrato pleomorfo di piccoli, medi e grandi linfociti (Figura 5).

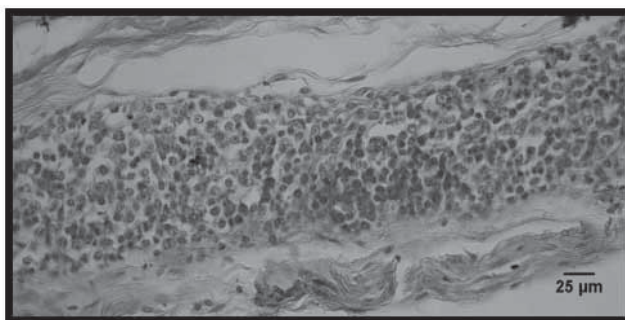
**Figura 3.** Pollo sano. Nervo sciatico. Aspetto istologico normale (40x).



**Figura 4.** Pollo. Nervo sciatico. Edema inter-neuritico con infiltrazione diffusa di piccoli medi e grandi linfociti; sono visibili anche numerose plasmacellule. Lesione ascrivibile a “tipo B” (40x) (campione 420/14).

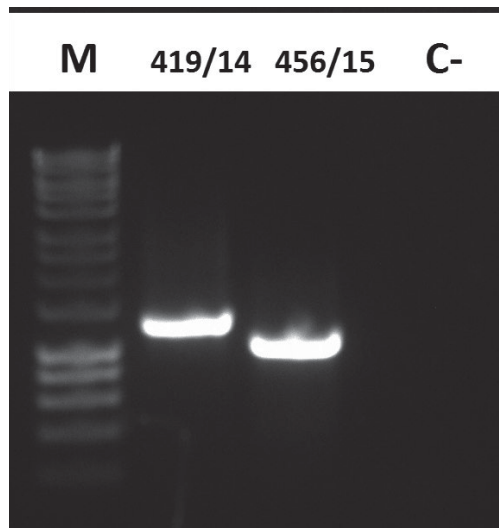


**Figura 5.** Pollo. Nervo sciatico. Infiltrato pleomorfo di piccoli, medi e grandi linfociti, compatibile con lesioni proliferative di “tipo A” (40x) (campione 420/14).



### PCR

I campioni esaminati sono risultati tutti positivi ai diversi protocolli di PCR eseguiti, producendo bande di amplificazione delle dimensioni attese, con la sola peculiarità dei prodotti di PCR ottenuti da amplificazione del gene *meq* dei campioni da allevamento rurale. Questi prodotti sono risultati infatti di maggiore peso molecolare (rispetto all'isoforma di riferimento ed al campione da allevamento intensivo 456/15) (Figura 6). L'indagine è stata approfondita con il sequenziamento del campione 456/15 e di un amplificato del campione 419/14.



**Figura 6.** Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di PCR su gene *meq* di campioni di penne. Linea 1: Marker Bioline (M). Linea 2: campione 419/14 da allevamento rurale banda di 1254 pb. Linea 3: campione 456/15 da allevamento commerciale banda di 1017bp. Linea 4: controllo negativo.

### *Sequenziamento ed analisi filogenetica*

Dall'analisi di sequenze è stato evidenziato come il gene *meq* del ceppo virale 419/14 (1254 pb), in paragone con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens, presenti un'inserzione di 57 paia di basi (tra i nucleotidi 758 e 759) corrispondente a 19 aminoacidi e 9 mutazioni, di cui 8 codificanti.

Sempre in paragone con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens, il gene *meq* del ceppo 456/15 (1017 pb), presenta invece una delezione di 180 pb (da 579 a 759) corrispondente a 60 aminoacidi e 5 mutazioni, 4 delle quali codificanti.

Nella Tabella II sono state riportate le più alte percentuali d'identità fra il ceppo 419/14 e vari ceppi di riferimento. La più alta identità nucleotidica (94,4%) si riscontra con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens.

**Tabella II.** Percentuali d'identità nucleotidica (nt) ed aminoacidica (aa) del ceppo 419/14 in paragone con alcuni ceppi di riferimento.

	<b>CVI988</b>	<b>CU-2</b>	<b>3008</b>	<b>GX060167</b>	<b>BC1</b>	<b>FTI58</b>	<b>JM102</b>	<b>L-MEQ</b>	<b>04-CRE</b>	<b>MPF57</b>	<b>02-LAR</b>
<b>419/14 (nt)</b>	94,4%	94,1%	94%	94%	93,8%	93,8%	93,8%	93,8%	93,5%	93,6%	93,4%
<b>419/14 (aa)</b>	92,7%	92,4%	92,7%	92,7%	92,1%	91,4%	91,9%	92,1%	91,4%	91,6%	91,1%

Al calcolo delle percentuali d'identità nucleotidica ed amminoacidica del ceppo 456/15 con ceppi di riferimento, è risultata una identità del 100% con i ceppi di origine polacca (tabella I). Con gli altri ceppi le percentuali d'identità scendono a valori minori del 98,5%, con percentuali maggiori con i ceppi *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus*.

All'analisi di sequenza è stato possibile anche valutare il contenuto di prolina ed il numero di ripetizioni di 4 proline (PPPP) nel dominio ricco di proline della proteina Meq (Tabella III).

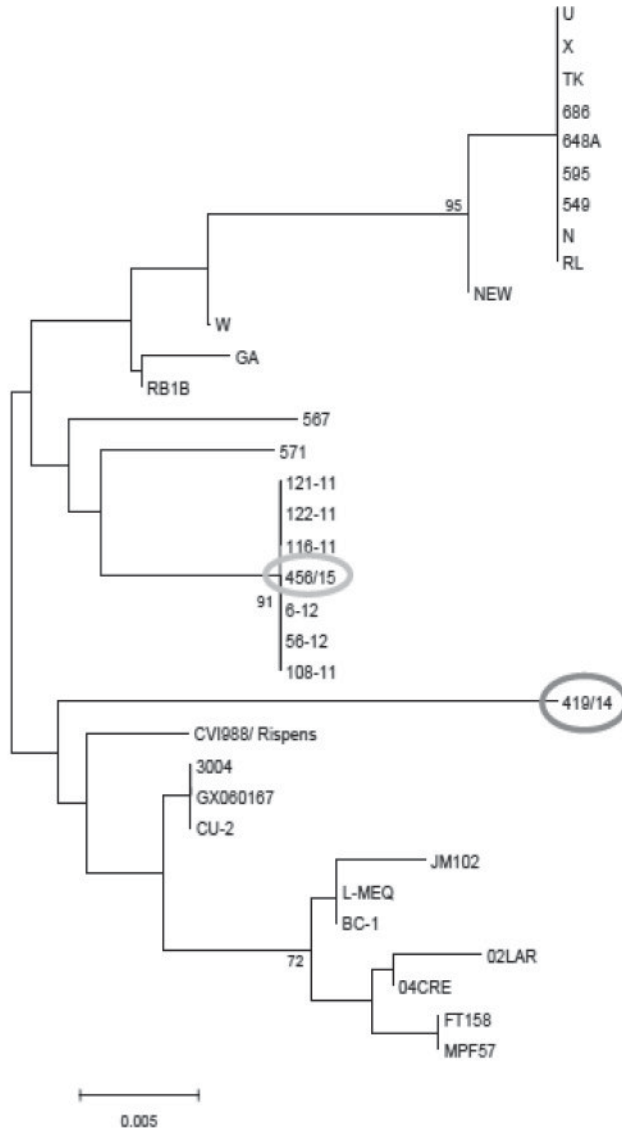
Il ceppo 419/14 ha presentato 9 ripetizioni PPPP e il 23,6 % di prolina; tali numeri sono in assoluto i maggiori riscontrati fra i ceppi esaminati. Il ceppo 456/15 invece ha presentato 4 ripetizioni PPPP, valore analogo a quello dei ceppi vMDV GA e 567.

**Tabella III.** Caratteristiche della proteina Meq nei ceppi 419/14 e 456/15 in paragone con ceppi di riferimento

ISOLATO	DIMENSIONE MEQ (aa)	DIMENSIONE INSERZIONE (aa)	% PROLINA	NUMERO DI PPPP	PATOTIPO
MPF57	398	59	22,9	5	vMDV
04CRE	398	59	22,2	5	vMDV
02LAR	398	59	22,2	5	vvMDV
FT158	398	59	22,9	5	vvMDV
CVI988/Rispens	399	60	23,3	8	attMDV
CU-2	398	59	23,1	7	mMDV
BC-1	398	59	23,1	7	vMDV
GA	339	-	21,5	4	vMDV
GX060167	398	59	23,1	6	ND
JM102	398	59	23,1	6	vMDV
RB1B	339	-	21,5	5	vvMDV
RL	339	-	20,6	2	vv+MDV
TK	339	-	20,6	2	vv+MDV
N	339	-	20,9	2	vv+MDV
New	339	-	20,7	2	vv+MDV
U	339	-	20,9	2	vv+MDV
W	339	-	21,2	4	vv+MDV
X	339	-	20,6	2	vv+MDV
549	339	-	20,6	2	vvMDV
567	339	-	21,2	4	vMDV
571	339	-	21,2	3	vMDV
595	339	-	20,6	2	vvMDV
648A	339	-	20,9	2	vv+MDV
686	339	-	20,9	2	vv+MDV
3004	398	59	23,1	6	attMDV
LMeq	398	59	23,1	7	ND
6_12	339	-	21,2	4	ND
56_12	339	-	21,2	4	ND
122_11	339	-	21,2	4	ND
121_11	339	-	21,2	4	ND
116_11	339	-	21,2	4	ND
108_11	339	-	21,2	4	ND
419/14	418	79	23,6	9	ND
456/15	339	-	21,2	4	ND

att=attenuato; m=mild; v=virulent; vv=very virulent; vv+= very virulent plus; ND= non determinato.

L'albero filogenetico generato sulle sequenze amminoacidiche della proteina Meq dei ceppi in esame, in Figura 7, mostra come, da un punto di vista filogenetico il ceppo 419/14 sia prossimo ai ceppi attenuati CVI988/Rispens e 3008 ed al ceppo *mild* CU-2, anche se non rientra in nessuno specifico cluster. Il ceppo 456/15 invece rientra nel cluster di ceppi isolati in Polonia.



**Figura 7.** Albero filogenetico dei ceppi MDV-1 considerati, basato sulla sequenza aminoacidica della proteina Meq. Sono cerchiati in verde (419/14) e in giallo (456/15) i ceppi isolati nel presente lavoro.

## DISCUSSIONE

Il ceppo 419/14 evidenziato nei polli rurali è classificabile, per le caratteristiche molecolari e per i riscontri clinici, necroscopici ed istologici come MDV-1 *mild*. La sintomatologia neurologica osservata nei soggetti colpiti è quella tipica della forma classica della malattia di Marek o “*fowl paralysis*” descritta nel 1907 da Marek. E’ riportato in letteratura che ceppi virali utilizzati come vaccini poco attenuati potrebbero causare forme nervose simili alla forma classica della malattia in animali di linea genetica sensibile (Bulow, 1977). Il riscontro, all’analisi di sequenza del ceppo 419/14, di una alta percentuale d’identità nucleotidica e aminoacidica con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens non permette di escludere tale ipotesi.

Nel 2003 è stata descritta in Italia da Massi *et al.*, una “Sindrome Neurologica Periferica” (PNS) (Bacon *et al.*, 2001) in galline di linea leggera bianche. Questa forma patologica continua ad essere segnalata in Italia nelle pollastre di linea leggera (Massi, comunicazione personale). Essa viene spesso confusa con la forma nervosa della malattia di Marek poiché determina ingrossamento dei nervi periferici e paralisi spastica agli arti. La PNS si osserva a partire da 6 settimane di vita mentre la malattia di Marek generalmente non compare prima della età di 8-9 settimane (Calnek e Witter, 1997). Nella PNS, all’esame istologico dei nervi si osserva una neurite linfo-plasmacellulare, quindi un quadro prettamente infiammatorio, associato in alcuni casi a demielinizzazione. Tali lesioni sono uguali alle lesioni nervose di tipo B della malattia di Marek; in quest’ultima però si possono osservare nei nervi anche lesioni di tipo A, ed è comune il riscontro concomitante di linfomi agli organi viscerali, cosa che non avviene nella PNS. La PNS sembra essere il risultato di una risposta autoimmune del soggetto (Bacon e Witter, 1994) condizionata dall’aplotipo della regione genomica del complesso maggiore d’istocompatibilità (MHC) o locus B. Sembra infatti che l’aplotipo B 19 sia responsabile sia della sensibilità nei confronti della malattia di Marek che dell’insorgenza della PNS. La PNS è stata anche attribuita ad una reazione immunitaria al vaccino Rispens, quando somministrato a dosi 2/3 volte maggiori della dose consigliata; questa pratica è piuttosto frequente in campo (Massi, comunicazione personale). Nel nostro caso in entrambi gli animali è stato identificato MDV-1 sia da penne che da organi, ed a carico dei nervi sono state riscontrate non solo lesioni di tipo B ma anche di tipo A (tipiche della malattia di Marek).

È stato dimostrato in passato da diversi autori, come esista una correlazione tra la struttura del gene *meq* e l’oncogenicità dei ceppi virali (Lee *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002; Shamblin *et al.*, 2004). In particolare è stato notato come a livello di regione del gene *meq* che codifica per un dominio di transattivazione della proteina Meq, ricco di ripetizioni di proline (*proline rich domain*), vi siano le basi molecolari della oncogenicità dei diversi ceppi virali. Shamblin *et al.* nel 2004 hanno notato che in alcuni ceppi a questi livelli si evidenziano delle inserzioni di nucleotidi *in-frame* con sequenze codificanti; in particolare i ceppi di MDV a bassa virulenza avrebbero un numero maggiore di ripetizioni dirette di sequenze



nucleotidiche in questa regione rispetto ai ceppi più virulenti. Il numero di queste sequenze ripetute varia tra i ceppi (Chang *et al.*, 2002) e la duplicazione di queste sequenze può avvenire sia per “*slippage*” della DNA polimerasi sia per meccanismi di ricombinazione, dando vita a diverse isoforme del gene *meq*, aventi diversa lunghezza, nei diversi ceppi virali. Le isoforme sono denominate: *meq* (1020bp), *L-meq* (large) (1200bp), *S-meq* (short) (897bp), *VS-meq* (very short) (744bp) (Chang *et al.*, 2002). La lunghezza del gene *meq* influenza la lunghezza della proteina Meq a causa dell’inserzione (o delezione) delle ripetizioni delle sequenze aminoacidiche nel dominio di transattivazione ricco di proline (Chang *et al.*, 2002). In questa zona della proteina sono localizzate delle ripetizioni di 4 proline (PPPP) il cui numero è maggiore nei ceppi virali a minor oncogenicità o non oncogenici mentre è minore nei ceppi altamente oncogeni. Un numero maggiore di ripetizioni PPPP determina una repressione dell’attività di transattivazione genica da parte della proteina che conduce ad una ridotta oncogenicità di quel ceppo virale (Chang *et al.*, 2002).

Il ceppo MDV-1 419/14 proveniente dall’allevamento rurale presentava nella proteina Meq il maggiore di ripetizioni PPPP in assoluto tra i ceppi analizzati. Esso presentava 9 ripetizioni PPPP in paragone con il ceppo CVI988/Rispens che ne presentava 8, ed i ceppi CU-2 e BC-1 che ne presentavano 7. In aggiunta, il contenuto percentuale di prolina, che rientra anch’esso fra i fattori di stima della patogenicità, ha il valore più alto osservato in assoluto (23,6%) per i ceppi esaminati. Questi dati evidenziano il basso potenziale oncogeno del ceppo MDV-1 dei polli rurali, confermato dalle osservazioni cliniche, necroscopiche ed istopatologiche.

Il ceppo MDV-1 456/15, isolato nei riproduttori, presentava invece 4 ripetizioni PPPP, così come riportato in tabella per ceppi *virulent* quali il GA e 567, anche se con un minor contenuto percentuale di prolina nella proteina Meq rispetto al ceppo GA. Dall’albero filogenetico si evince che da un punto di vista filogenetico il ceppo 419/14 è prossimo ai ceppi attenuati CVI988/Rispens e 3008 e *mild* (CU-2), anche se non rientra in nessun cluster. Il ceppo 456/15, invece, formava un cluster unico con ceppi isolati in Polonia.

## CONCLUSIONI

Il ceppo 419/14 MDV-1 evidenziato durante questo studio in polli di allevamento rurale, è risultato essere un ceppo *mild* non solo su base molecolare, ma anche sintomatologica ed anatomico-istopatologica. In diagnosi differenziale è stata considerata la Sindrome Neurologica Periferica. Essa è stata esclusa con buona probabilità per le ragioni precedentemente discusse, quali principalmente la gravità delle lesioni ai nervi. Le caratteristiche molecolari del ceppo virale evidenziato, che lo rendono molto vicino a un ceppo vaccinale CVI988/Rispens del commercio, non permettono di escludere la possibilità che esso sia un ceppo tornato a virulenza dopo retropassaggi in allevamento su ospiti naturali, o sia un diverso ceppo MDV-1 vaccinale. In ambedue i casi, il virus potrebbe avere raggiunto l’al-

levamento rurale superando le barriere di biosicurezza applicate all'allevamento intensivo, venendo a contatto, con elevate cariche ambientali, con animali giovani di linee genetiche rurali particolarmente sensibili. Per confermare queste ipotesi lo studio andrebbe ampliato paragonando il ceppo 419/14 con altri ceppi vaccinali MDV-1 del commercio. Data la scarsità dei dati in letteratura sui ceppi di MDV circolanti in Italia, i risultati del presente lavoro portano un contributo originale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bacon LD and RL Witter. (1994). Serotype specificity of B-haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease vaccines. *Avian Diseases* 38: 65-71.
2. Bacon LD, Witter RL and RF Silva. (2001). Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens. *Avian Pathology* 30: 487-499.
3. Bulow VV. (1977). Further characterisation of the CVI 988 strain of Marek's disease virus. *Avian Pathology* 6: 395-403.
4. Camarda A., Di Pineto L. (2013). Incontro "Stato sanitario dell'avicoltura Italiana: focus sulle principali malattie osservate durante il 2012" Stato sanitario della gallina ovaiole in Italia. LI Convegno annuale, Salsomaggiore Terme (PR), 11-12 ottobre 2012. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2013, LII convegno annuale. Forlì, 11-12 aprile 2013. Pp. 49-57.
5. Calnek BW and RL Witter. (1997). Marek's disease. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard GW, McDougald LR, Saif YM (Eds). *Diseases of Poultry* 10th edn, Iowa State University Press, Ames, IA pp. 369-413.
6. Chang KS, Lee SI, Ohashi K, Ibrahim A, and M Onuma. (2002). The detection of the meq gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 413-417.
7. Dunn JR., Witter RL, Silva RF, Lee LF, Finlay J, Marker BA, Kaneene JB, Fulton RM and SD Fitzgerald. (2010). The Effect of the Time Interval Between Exposures on the Susceptibility of Chickens to Superinfection with Marek's Disease Virus. *Avian Diseases* 54: 1038-1049.
8. Hassanin O, Abdallah F and IE El-Araby. (2013). Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Marek's Disease Virus from Clinical Cases of Marek's Disease in Egypt. *Avian Diseases* 57: 555-561.
9. Lee, SI, Takagi M, Ohashi K, Sugimoto C and M Onuma. (2000). Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 287-292.

10. Payne LN and PM Biggs. (1967). Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 39: 281-302.
11. Piccirillo A. (2011). Malattia di Marek nei riproduttori pesanti: una malattia riemergente del settore avicolo? Atti della Società L Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì 7-8 aprile 2011.
12. Schat KA and V Nair. (2008). Marek's disease. In: Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (Eds). *Disease of Poultry* 12th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 452-514.
13. Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL and MS Parcels. (2004). Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Veterinary Microbiology* 102, 147-167.

## IL MONITORAGGIO QUALE ELEMENTO ESSENZIALE NEL CONTENIMENTO DEL *DERMANYSSUS GALLINAE*

Pampiglione G.<sup>1</sup>, Trevisani G.<sup>1</sup>, Scaravelli D.<sup>2</sup>

1 - Consulente Entomologo, Via A. Gramsci n. 7, 47016 Predappio email [guglielmo@pampiglione.com](mailto:guglielmo@pampiglione.com)

2 - Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO) email: [edino.scaravelli@unibo.it](mailto:edino.scaravelli@unibo.it)

**Summary.** *Dermanyssus gallinae* is still the main ectoparasitic problem of poultry, mainly in hens industry. Monitoring procedures have to be developed in order to determine intervention thresholds related to infestation level, detected by traps or by spotted eggs. The different moments in production cycle need different intervention related to the temperature of the site, presences of hens and treatment history of the production unit. The fundamental importance of a quality inspector is discussed and the importance of the pro-active investment in knowledge is underlined.

### INTRODUZIONE

*Dermanyssus gallinae* è oggi la più grave ectoparassitosi degli allevamenti avicoli. In Europa la spesa per il controllo ed i costi legati ai cali produttivi è stata stimata intorno ai 130 milioni di euro annui. Valori simili si lamentano in molte altre zone del mondo (Stafford *et al.*, 2006). L'infestazione da *D. gallinae* si conclama nella sua massima gravità nel settore delle galline ovaiole, in quanto il lungo ciclo produttivo fornisce all'acaro un contesto maggiormente favorevole alla sua sopravvivenza e replicazione (Mul *et al.* 2010, Giangaspero *et al.*, 2012). In Francia, Danimarca, Olanda, Polonia, Romania, Svezia ed Italia la prevalenza nelle aziende avicole raggiunge percentuali superiori al 70%, con picchi di oltre il 90% negli allevamenti di piccola e media estensione (Sparagano *et al.*, 2014). L'effetto più consistente della parassitosi sulla gallina ovaiole è un forte stress dovuto alle ripetute punture da *D.gallinae*, concentrate soprattutto nelle ore notturne (Kowalski e Sokól, 2009). A questo seguono marcato nervosismo, aggressività, cannibalismo e scadimento delle condizioni generali dell'animale che esitano in calo dell'ovodeposizione e mortalità secondaria. Oltre a ciò *D.gallinae* ha dimostrato capacità vettoriali per molti agenti patogeni, sia virali che batterici (Chauve 1998, Sparagano *et al.* 2012). Le attuali strategie di controllo sono tipicamente incentrate sul trattamento di locali e attrezzature mediante l'utilizzo di prodotti acaricidi. Tuttavia le caratteristiche biologiche ed etologiche di questo acaro lo rendono altamente invasivo e notoriamente difficile da eradicare (Maurer e Baumgärtner, 1994). Con l'intensificarsi degli scambi commerciali, sia di animali che di uova, *D.gallinae* ha inoltre trovato un ottimo metodo di diffusione sia su piccola che su larga scala e ha sviluppato recentemente anche alte capacità di resistenza nei confronti delle più diffuse molecole acaricide di origine sintetica (Marangi *et al.*, 2012). La già complessa situazione oggi in Europa si fronteggia anche con la sempre maggiore necessità, anche legislativa, di limitare l'utilizzo di pesticidi di sintesi scarsamente ecocompatibili.

L'approccio qui presentato volge appunto alla creazione di un processo di attenzione che fornisca un approccio olistico e fattivo all'insieme delle problematiche.

### **LA PROPOSTA OPERATIVA**

Il monitoraggio ha una componente fondamentale rispetto ad una visita ispettiva: va ripetuto. Il fattore temporale e di verifica costante per il problema *D.gallinae* è fondamentale. La procedura di monitoraggio parte dall'osservazione dell'infestante in un determinato momento, crea le condizioni decisionali e prevede una tempistica di riscontro successiva. L'esperienza indica che è importante seguire le diverse fasi del ciclo delle ovaiole in quanto l'infestazione spesso viene sottovalutata in quanto verificata in un solo momento. Le tecniche di verifica inoltre si differenziano così come poi l'operatività di controllo a seconda che ci si trovi nel momento di vuoto sanitario, nel pre accasamento o in produzione. Variano infatti non solo la presenza o meno degli ospiti ma anche le condizioni termiche, di umidità relativa e spesso della disponibilità dei rifugi.

Quindi il monitoraggio non serve solo per decidere se e quanto usare biocidi ma di porre in opera un vero protocollo di biosicurezza ottenendo nel contempo strumenti per valutare l'efficacia dello sforzo.

Il monitoraggio deve agire per verificare la pulizia, consigliare azioni di lotta preventiva (chimica e fisica) e poi, verificando il grado di infestazione, promuovere un piano di gestione.

Risulta fondamentale per la riuscita di un monitoraggio la formazione del personale, non solo tecnico ma anche operativo. L'esperienza mostra come la spesa di formazione viene ripagata in termini economici e funzionali già nei primi cicli produttivi.

Non è una lotta facile, è onerosa e la pianificazione del lavoro così come il monitoraggio sono fondamentali. Durante la produzione bisogna strutturare gli interventi, considerando la soglia economica in modo attivo. Mentre vi sono soglie di intervento specifiche per la lotta alle infestanti delle derrate nell'industria alimentare non è codificata quella relativa all'acaro rosso. Questo aspetto ha risvolti complessi non solo per programmare meglio la lotta ma per esempio anche nel confronto con il servizio sanitario pubblico che non ha un punto di riferimento per eventuali interventi.

Si propongono quindi soglie empiriche di attenzione e risposta differenziate a seconda delle fasi del ciclo produttivo. Considerando 30 uova da verificare per ogni unità produttiva, le soglie sono così distinte. Soglia A: poche macchie (1 -6 in tutto). Livello Attenzione - condurre ispezioni mirate nei punti critici nel capannone ed eventualmente eseguire trattamenti mirati. Soglia B: da 6 a 10 in tutto. Livello Critico - intervenire subito in tutta l'unità produttiva. Soglia C: >11 uova macchiate. Livello Pericolo - intervenire subito in tutto il capannone.

Nel pre-accasamento gli acari sono vivi ma nascosti e dormienti. Divengono attivi e cercano il pasto con l'arrivo degli ospiti e il riscaldamento dell'ambiente. A capannone pieno sono molto attivi e riproduttivi e quando viene svuotato, prima del suo raffreddamento e pulizia, gli acari sono ancora attivi e possono essere raggiunti dai trattamenti. A capannone freddo si sono ritirati nei rifugi e deve essere impiegato notevole sforzo per raggiungerli.

La gestione quindi dei problemi di infestazione deve passare da una attenta verifica non solo del livello di pulizia, che deve essere seguita da un controllo ispettivo con trappole e osservazione dell'esperto sul rimanere di nuclei infestanti, ma anche di una adeguata programmazione e verifica dei trattamenti. Ogni investimento effettuato in via preventiva nel monitoraggio e nell'attenta programmazione dei trattamenti è sempre ripagata da una diminuzione degli interventi successivi, nell'abbassamento dei possibili residui e in uno stress minore sugli ospiti e quindi migliore produttività.

## **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.
- Kowalski A., Sokol R. 2009. Influence of *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) invasion on the plasma levels of corticosterone, catecholamines and proteins in layer hens. *Pol. J. Vet. Sci.* **12**: 231-235.
- Giangaspero A, Marangi M, Bonassisa L, Camarda A, Cafiero M, Sparagano O (2012). Controllo chimico di *Dermanyssus gallinae* e rischi correlati. *Sanità Pubblica Veterinaria* 75.
- Marangi M., Morelli V., Pati S, Camarda A., Cafiero M.A., Giangaspero A., 2012. Acaricide Residues in Laying Hens Naturally Infested by Red Mite *Dermanyssus gallinae*. *PLoS ONE* 7(2): e31795.
- Maurer V., J. Baumgärtner, 1994. A population model for *Dermanyssus gallinae* (Acari, Dermanyssidae). *Exp Appl Acarol* 18:409–422.
- Mul M.F., van Niekerk T.G., Groot Koerkamp P.W. 2010. Biology and monitoring of *Dermanyssus gallinae* in poultry farms. *Parassitologia* 52(1-2): 65-67.
- Sparagano O., George D.R., Harrington D.W., Giangaspero A., 2014. Significance and control of the Poultry Red Mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annu. Rev. Entomol.* **59**: 447-466.
- 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.
- Stafford K.A., Lewis P.D., Coles G.C., 2006. Preliminary study of intermittent lighting regimes for red mite (*Dermanyssus gallinae*) control in poultry houses. *Vet. Rec.* **158**: 762-763.

# INSORGENZA E PREVALENZA DI “WHITE STRIPING” IN BROILER PESANTI SOTTOPOSTI A DIVERSI PROGRAMMI DI CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI

Russo E.<sup>1</sup>, Dalle Zotte A.<sup>2</sup>, Recordati C.<sup>3</sup>, Longoni C.<sup>1</sup>, Tasoniero G.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>4</sup>, Felice V.<sup>4</sup>, Cecchinato M.<sup>2</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> *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)*

<sup>3</sup> *Mouse & Animal Pathology Laboratory, Fondazione Filarete, Viale Ortles 22/4, 20139, Milano*

<sup>4</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO)*

## Summary

White striping (WS) is a muscle alteration characterized by the presence of white striations parallel to the direction of muscle fibers that affects poultry meat. To evaluate the age of WS onset in broiler chickens, and the effect of diet and different coccidiosis control programs on WS prevalence an experimental study was conducted on 180 chickens. One-day-old chicks were randomly divided into four experimental treatments: control, coccidiostat, vaccinated, and vaccinated fed with a low energy diet. Twenty animals per treatment were sacrificed at 12 and 25 days of age, breasts were scored for WS (0=absence, 1=mild, 2=severe) and a sample of each breast was collected for histology. The remaining chickens were slaughtered at 51 days of age and breasts were scored for WS.

WS appearance was detected grossly only at 25 and 51 days, but histological lesion were present since 12 days of age.

At 51 days the WS prevalence was above 90% in all groups, no differences were found between the two different diets, but a significantly higher prevalence of score 2 was present in the Coccidiostat group vs others ( $P < 0.001$ ), suggesting a coccidiostat effect on WS appearance.

## INTRODUZIONE

Il White Striping (WS) è un'alterazione del muscolo del broiler caratterizzata dalla presenza di striature bianche parallele alla direzione delle fibre muscolari (1).

Il WS può essere classificato, a seconda della gravità in 3 categorie: muscolo normale (grado 0), muscolo con moderato WS se presenta un moderato numero striature bianche di spessore inferiore ad 1 mm (grado 1), muscolo con grave WS, se le striature sono numerose e di spessore superiore ad 1 mm (grado 2) (2, 3).

Istologicamente le lesioni riscontrate su muscoli in corso di WS sono polifasiche e comprendono fenomeni degenerativi, infiammatori e rigenerativi; negli stati più avanzati si evidenzia fibrosi e sostituzione delle fibre muscolari con adipociti (3).

La presenza di WS ha un'incidenza macroscopica osservata sia sperimentalmente che al macello che va dal 12 ad oltre il 70% (4, 5, 6).



Da un punto di vista commerciale questa alterazione sta acquisendo sempre maggiore importanza per il settore produttivo. La presenza di WS non compromette la salubrità delle carni, ma ne altera le caratteristiche chimico-fisiche, rendendo le carni fresche affette da questo problema poco gradite al consumatore (7). Questo difetto incide inoltre sulle proprietà nutrizionali della carne con un aumento del contenuto di grassi e una riduzione della quota proteica (4). Quando il WS è presente in forma grave le carni risultano poco idonee alla preparazione di lavorati, in quanto si determinano modificazioni del pH e del potere di ritenzione idrica, scarsa coesione delle fibre muscolari e notevoli perdite di peso durante la cottura (5).

La patogenesi del WS è ancora sconosciuta, ma diversi studi hanno dimostrato che la sua prevalenza è collegata alle performance di crescita degli animali e al peso di macellazione (1, 4, 8). Anche la dieta può influenzare la manifestazione del WS, infatti animali alimentati con diete a livello energetico molto basso hanno evidenziato una prevalenza di WS inferiore a quelli alimentati con diete a livello energetico molto alto (4). La quantità di vitamina E presente nella dieta, al contrario non sembra condizionare la gravità del WS (8). Un fattore che ancora non è stato indagato è l'impiego di coccidiostatici, riportato in letteratura come una possibile causa di tossicità a carico della muscolatura scheletrica del pollo da carne ma anche di altri animali quali lo struzzo e il suino (9, 10, 11).

Tale studio si propone di indagare l'effetto dell'assunzione di coccidiostatico o vaccinazione anticoccidica in animali alimentati con diete a diversa concentrazione energetica sulla prevalenza di lesioni da WS.

## **MATERIALI E METODI**

### *Disegno sperimentale*

Per questa prova sperimentale sono stati accasati 720 pulcini di un giorno di vita e divisi in maniera casuale in 4 gruppi: Controllo (C), Coccidiostatico (Cox), Vaccinati (V), e Vaccinati ma alimentati con una dieta a basso contenuto energetico (VLE).

Al gruppo C, è stato somministrato un piano alimentare (1-12 giorni mangime starter, 13-25 giorni II periodo, 26-42 giorni III periodo, 42-51 giorni finissaggio) con mangimi standard senza l'aggiunta di coccidiostatico e gli animali non sono stati vaccinati per la coccidiosi.

Il gruppo Cox ha ricevuto il medesimo piano alimentare e gli stessi mangimi del gruppo C, con la sola aggiunta di coccidiostatico (0-24 giorni Maxiban®G160 premix, 25-42 giorni Elancoban®200 premix, al dosaggio previsto dal foglietto illustrativo di 500 g/ton).

I gruppi sperimentali V e VLE sono stati vaccinati per la coccidiosi (Paracox 5, somministrazione in acqua di bevanda a 3 giorni). Il gruppo V ha ricevuto lo stesso piano alimentare e mangime del gruppo C, mentre il gruppo VLE ha ricevuto lo stesso piano alimentare ma con mangimi a ridotto livello energetico nel III periodo e nel finissaggio.

Durante lo studio è stato valutato il peso vivo individuale ad ogni cambio mangime ed il consumo alimentare di gruppo.

A 12 e 25 giorni di età sono stati sacrificati 20 animali per ciascun gruppo, i petti sono stati isolati dalla carcassa, pesati e valutati per WS seguendo la scala di punteggi proposta da Kuttappan *et al.* (3). È inoltre stato effettuato un prelievo di tessuto muscolare dalla porzione craniale del muscolo pettorale che è stato posto in formalina al 10% per la successiva analisi istologica.

Gli animali rimanenti sono stati regolarmente macellati a 51 giorni, le carcasse sono state processate presso un laboratorio di sezionamento ed i petti sono stati pesati e valutati per WS seguendo la scala di punteggi proposta da Kuttappan *et al.* (3).

#### *Analisi istologica*

I campioni sono stati inclusi in paraffina e colorati con Ematossilina-Eosina. È stata poi valutata la presenza/assenza di lesioni muscolari (degenerazione, infiammazione) in quasi la totalità dei campioni prelevati (sono stati valutati 68/80 campioni prelevati a giorno 12 e 75/80 prelevati a giorno 25).

#### *Analisi statistica*

Il software utilizzato per l'analisi statistica è SAS (2004) versione 9.3. Il peso vivo e l'accrescimento medio giornaliero sono stati analizzati con ANOVA. L'effetto del trattamento e del peso sui punteggi di WS è stato valutato mediante un'analisi ANCOVA.

### **RISULTATI**

Il peso degli animali e l'accrescimento medio giornaliero nei 4 gruppi sono riportati in Tabella 1.

A 12 giorni di età i petti sono risultati tutti macroscopicamente normali, l'analisi istologica ha rivelato la presenza di minime lesioni di tipo degenerativo in 55 campioni su 68 analizzati (80,9%).

A 25 giorni comincia a comparire il WS di grado 1 in 3/20 animali nel gruppo C, 2/20 nel gruppo Cox, 3/20 nel gruppo V e 1/20 nel gruppo VLE. Non erano evidenti le lesioni di grado 2. A livello istologico si sono evidenziate lesioni di tipo degenerativo da lievi a moderate in tutti i 75 campioni attualmente analizzati (100%), si cominciano inoltre a riscontrare in alcuni campioni fenomeni infiammatori, infiltrazione di grasso, e in qualche caso anche fibrosi.

A 51 giorni la prevalenza di WS è risultata superiore al 90% in tutti i gruppi sperimentali, la prevalenza totale e le prevalenze dei diversi gradi di WS nei diversi gruppi sono riportati in Tabella 2.

### **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

La presenza di minime alterazioni istologiche in buona parte dei campioni prelevati a 12 giorni di età, in assenza della lesione macroscopica, fa ipotizzare che l'insorgenza del WS si possa collocare nella seconda settimana di vita del pulcino. A 25 giorni di età si è evidenziato un aggravamento del quadro istologico associata all'insorgenza di lesioni macroscopiche in fase iniziale.

A 51 giorni di età si è evidenziato un livello molto elevato di WS in tutti e quattro i gruppi, senza differenze statisticamente significative. Alcune differenze si sono però riscontrate nella percentuale di WS di grado 2. Il gruppo COX è risultato avere una percentuale significativamente più alta di WS rispetto ai due gruppi vaccinati. Questo potrebbe essere dovuto sia ad un effetto diretto di tipo tossico del cocci-diostatico sul muscolo, che alla differente curva di crescita che ha caratterizzato i soggetti di questo gruppo. Nel complesso, l'accrescimento medio giornaliero è risultato simile nei tre gruppi COX, V e VLE, ma mentre il gruppo COX è stato caratterizzato da un accrescimento molto rapido nelle prime settimane e poi da un rallentamento, i gruppi V e VLE hanno manifestato un accrescimento più lento fino ai 25 giorni, seguito da un recupero. Questo accrescimento molto spinto proprio nel periodo di insorgenza del WS potrebbe aver accelerato il processo ed aggravato le lesioni riferibili a WS riscontrate in fase di macellazione. Ulteriori studi saranno tuttavia necessari per indagare meglio questo fenomeno ed individuarne la causa. Le diete impiegate nel presente studio hanno dimostrato di non avere effetti sull'insorgenza di WS. In letteratura differenze importanti nel livello energetico della dieta avevano determinato variazioni di prevalenza del WS e del peso medio degli animali (13). In questo studio, sebbene la dieta somministrata al gruppo VLE fosse caratterizzata da un inferiore livello energetico rispetto alle altre, il gruppo VLE ha presentato risultati produttivi del tutto paragonabili a quelli degli altri gruppi, giustificando l'assenza di effetto sulla prevalenza di WS.

## **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., 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.
5. 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
6. 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. (2014). *Atti del LIII Convegno annuale SIPA.*
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. Chapman H. D., Jeffers T. K., Williams R. B. (2010). Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry Science* 89: 1788-1801.
11. Dedoussi A., Roubies N., Tserveni-Goussi A. (2007). Monensin toxicity in ostriches on a farm in northern Greece. *Veterinary record* 161: 628-629.
12. Umemura T., Kawaminami A., Goryo M., Itakura C. (1985). Enhanced myotoxicity and involvement of both Type I and II fibers in monensin-tiamulin toxicosis in pigs. *Veterinary Pathology* 22: 409-414.
13. Kuttappan, V. A., S. Goodgame, D. Bradley, A. Mauromoustakos, B. Hargis, P. Waldroup, and C. Owens. 2012b. Effect of different levels of dietary vitamin E (dl- $\alpha$ -tocopherol acetate) on the occurrence of three degrees of white striping on broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 91:3230–3235.

**Tabella 1.** Peso vivo medio e accrescimento medio giornaliero degli animali.

Parametro	Età	Gruppo C	Gruppo COX	Gruppo V	Gruppo VLE
<b>Peso vivo medio (g)</b>	12 giorni	370 <sup>B</sup>	409 <sup>A</sup>	402 <sup>A</sup>	417 <sup>A</sup>
	25 giorni	1277 <sup>ABa</sup>	1308 <sup>A</sup>	1199 <sup>C</sup>	1222 <sup>BCb</sup>
	42 giorni	2635 <sup>C</sup>	3033 <sup>A</sup>	2826 <sup>B</sup>	2992 <sup>A</sup>
	<b>51 giorni</b>	<b>3489<sup>b</sup></b>	<b>3667<sup>a</sup></b>	<b>3593<sup>ab</sup></b>	<b>3672<sup>a</sup></b>
<b>Accrescimento medio giornaliero (g/die)</b>	1-12 giorni	27.4 <sup>B</sup>	30.6 <sup>A</sup>	30.0 <sup>A</sup>	31.2 <sup>A</sup>
	13-25 giorni	69.5 <sup>A</sup>	69.2 <sup>A</sup>	61.4 <sup>B</sup>	62.0 <sup>B</sup>
	25-42 giorni	80.3 <sup>C</sup>	102 <sup>ABa</sup>	95.2 <sup>Bb</sup>	105 <sup>A</sup>
	42-51 giorni	94.9 <sup>Aa</sup>	66.7 <sup>C</sup>	85.4 <sup>ABb</sup>	75.1 <sup>BCc</sup>
	<b>Ciclo completo</b>	<b>67.6<sup>b</sup></b>	<b>71.1<sup>a</sup></b>	<b>69.6<sup>ab</sup></b>	<b>71.2<sup>a</sup></b>

<sup>a, b</sup> Medie nella stessa riga seguite da lettere minuscole diverse sono significativamente diverse  $P \leq 0.05$

<sup>A, B</sup> Medie nella stessa riga seguite da lettere maiuscole diverse sono significativamente diverse  $P \leq 0.01$

**Tabella 2.** Prevalenza di WS covariata per il peso vivo di macellazione.

Grado di WS	Prevalenza di WS (%)			
	Gruppo C	Gruppo COX	Gruppo V	Gruppo VLE
WS grado 0	1.6	3.3	3.9	7.3
WS grado 1	36.8 <sup>a</sup>	19.1 <sup>b</sup>	33.5 <sup>a</sup>	28.3 <sup>ab</sup>
WS grado 2	61.6 <sup>B</sup>	77.6 <sup>Aa</sup>	62.6 <sup>B</sup>	64.4 <sup>ABb</sup>
WS totale	98.4	96.7	96.1	92.7

<sup>a, b</sup> Medie nella stessa riga seguite da lettere minuscole diverse sono significativamente diverse  $P \leq 0.05$

<sup>A, B</sup> Medie nella stessa riga seguite da lettere maiuscole diverse sono significativamente diverse  $P \leq 0.01$

## INDAGINI SU *STREPTOPELIA DECAOCTO* CONFERITE ALL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO DI FORLÌ NEGLI ANNI 2011-2014

Scaravelli D.<sup>1</sup>, Terregino C.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>3</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> Centro di Referenza Nazionale per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università, 10 - Legnaro (PD)

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Sezione di Forlì, via Marchini 1, 47122 Forlì

### Summary

Collared dove *Streptopelia decaocto* (Frisvaldszky, 1838) is a widespread species in Europe, which typically lives in villages and towns, often nesting on trees and houses. It is well known for being a possible *reservoir* of zoonotic diseases, such as Trichomoniasis or other bacterial infections. This species are commonly affected by Avian Paramyxovirus 1 and are also proved to be sensitive to West Nile Disease with ascertained *spill over* cases. In order to investigate the causes of death and detect the presence of zoonotic agents affecting this important bioindicator, the Forlì section of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna implemented a surveillance on dead doves collected throughout its area of competence. Between 2011 and 2014, 143 dead doves were collected and tested, with a peak of findings at the end of winter. No positive cases for Avian Influenza, West Nile, Usutu, Flavivirus and Salmonella were found, whereas two cases of Trichomoniasis were identified. Avian Paramyxovirus type 1 (pigeon variant) were found in more than 80% of cases, with a high prevalence of the sublineage 4b, while sublineage 4a was only found in 2011 and 2012 in a lower percentage.

### Introduzione

La Tortora dal collare o Tortora orientale *Streptopelia decaocto* (Frisvaldszky, 1838) è un Columbidae originario dell'Asia, ma che nel XX secolo ha avuto una forte espansione in Europa. Oggi è presente in tutta Italia ed in espansione (Campedelli et al 2012). Tale trend è evidente anche in Romagna (Gellini e Ceccarelli 2000), dove diviene tra le specie dominanti in ambito cittadino (Ceccarelli et al. 2006). Specie sedentaria di taglia media, ha abitudini diurne e confidenti, visitando assiduamente giardini e parchi cittadini dove si nutre soprattutto di semi comunque integrati da frutta, erbe, insetti e piccoli invertebrati. Il periodo di riproduzione si concentra tra marzo e settembre, ma può deporre tutto l'anno nelle condizioni di sinantropia. Nei nidi rozzi posti su alberi o strutture depone 1-2 uova che cova 14-16 giorni e i giovani si involano a 17-22 giorni dalla schiusa. Possono esservi più cicli riproduttivi durante l'anno. Queste caratteristiche di plasticità comportamentale e produttività la pongono

tra le specie molto adatte alla convivenza con l'uomo e che traggono notevoli vantaggi nel vivere in città di tutti i tipi e dimensioni.

La Tortora orientale rappresenta quindi una ottima specie da utilizzarsi per il monitoraggio sanitario dei sinantropici, essendo potenzialmente in grado di fungere da *reservoir* per alcuni agenti zoonotici quali in particolare le Tricomoniassi (Lennon et al. 2013) o gli aspetti virali tipici dei columbiformi (Marlier e Vindevogel 2006) tra cui ovviamente i Paramyxovirus (Krysten et al 2012) con una accertata sensibilità alla West Nile con anche casi di *spill over* (Taddei et al. 2011, Bonfante et al. 2012, Panella et al 2012).

In questo contesto la Sezione di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna sta raccogliendo da tempo ulteriori informazioni sullo stato delle Tortore presenti sul proprio territorio di competenza e in particolare per quelle ritrovate morte nelle aree cittadine e nei territori adiacenti.

### **Materiali e metodi**

Gli esemplari sono stati raccolti sul territorio di competenza da diversi operatori di Sanità Pubblica e da privati cittadini che hanno consegnato all'Istituto esemplari deceduti per una valutazione delle cause di morte. Per ogni esemplare è stato effettuato il rilievo necroscopico, la ricerca del virus della Malattia di Newcastle mediante la tecnica di RT-PCR (Kho et al.,2000) e la ricerca del virus Influenzale di tipo A mediante RT-Real Time PCR (OIE, 2014). Su una piccola parte di soggetti si è proceduto alla ricerca di Salmonella, Usutu, West Nile, Flavivirus ed all'esame parassitologico con metodologie standard.

In seguito alle positività riscontrate in RT-PCR per Malattia di Newcastle si è proceduto nella maggior parte dei casi all'isolamento su uova embrionate SPF inoculate per via intrallantoidea (Alexander 1989) al fine di inviare il ceppo isolato al Centro di Referenza Nazionale per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle di Padova per la caratterizzazione molecolare.

Gli isolati inviati al Centro di Referenza sono stati caratterizzati antigenicamente mediante test di HI. L'analisi della porzione ipervariabile della proteina di fusione (F) comprendente il sito di clivaggio ha permesso di identificare il patotipo genetico e di identificare il genogruppo specifico (Aldous et al 2003). Su un certo numero selezionato di isolati è stato effettuato il test di patogenicità in vivo (ICPI).

### **Risultati**

Dal 2011 al 2014 sono stati consegnati alla sede di Forlì 143 esemplari. Qui si considerano i rilievi effettuati su 128 esemplari dopo aver escluso quelli inadatti per cattive condizioni di conservazione e quelli di allevamenti privati. Nel 2011 sono stati conferiti 55 soggetti, nel 2012 15, nel 2013 24 e nel 2014 34 tortore. Il conferimento è avvenuto soprattutto in novembre e febbraio, con un picco negativo in maggio e giugno, senza differenze significative tra i diversi anni (Figura 1).

Sui 128 casi sottoposti a riscontro di laboratorio sono stati conseguiti i risultati riuniti in Tabella 1.



**Figura 1. Soggetti analizzati nei diversi mesi/anno**

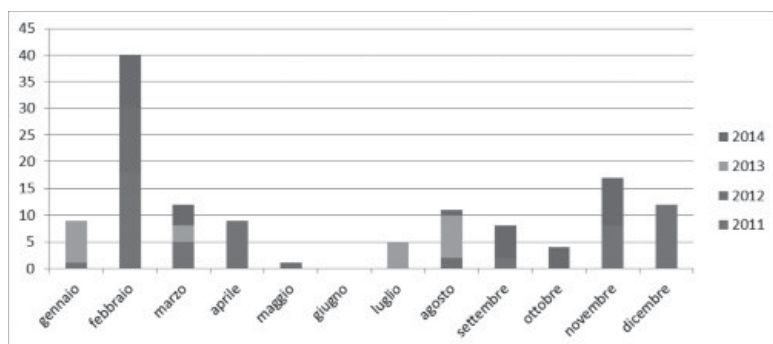


Tabella 1. Numero casi sottoposti ad indagine e relative positività

	<b>APMV-1 (PPMV-1)</b>	<b>Influenza virus A</b>	<b>Tricomoniassi</b>	<b>Flavivirus</b>
N. casi con ricerca specifica	99	96	2	3
Positivi/Negativi	82 / 17	0 / 96	2 /	0 / 3
%	82,83 / 17,17	0 / 100	100 / 0	0 / 100

	<b>West Nile virus</b>	<b>Usutu virus</b>	<b>Salmonella spp.</b>
N. casi con ricerca specifica	5	5	7
Positivi/Negativi	0 / 5	0 / 5	0 / 7
%	0 / 100	0 / 100	0 / 100

Se per virus influenzali, West Nile e Usutu virus, così come per Salmonella e Flavivirus, nonostante i pochi soggetti esaminati, le tortore sono risultate sempre negative, si ha una prevalenza dell'82% per la variante piccione (PPMV-1) del Paramyxovirus aviare di tipo 1 (tra cui si ascrivono i virus della malattia di Newcastle). Due sono i casi positivi alla Trichomoniasi.

Considerando la distribuzione geografica dei risultati, non appare esserci una suddivisione significativa per località di ritrovamento (Tabella 2).

**Tabella 2. Distribuzione risultati positivi su 123 casi analizzati per i due virus.**

<b>Luogo di ritrovamento</b>	<b>N casi</b>	<b>% APMV-1 (PPMV-1)</b>	<b>Luogo di ritrovamento</b>	<b>N casi</b>	<b>% APMV-1 (PPMV-1)</b>
Bertinoro	9	88,9	Milano marittima	1	0
Cesena	5	80	Montescudo	6	100
Cesenatico	1	100	Rimini	41	53,7
Coriano	3	100	San Giovanni in M.	2	100
Faenza	23	60,9	San Tomé di Forlì	3	0
Forlì	17	64,7	Santarcangelo di R.	3	100
Forlimpopoli	4	75	Sogliano al Rubicone	1	100
Grisignano	1	100	Villafranca di Forlì	3	100

La genotipizzazione del Paramyxovirus aviare tipo 1 ha mostrato una netta prevalenza del genogruppo 4b (Tabella 3) mentre il genogruppo 4a è stato rilevato solo nel 2011 e 2012 su 4 e 6 casi rispettivamente. Quando effettuato, il test di patogenicità in vivo (test di ICPI) ha presentato un range di valori tipico di questi virus (0,3 – 1,2).

Tabella 3. Prevalenza dei sottogruppi dei ceppi di PPMV- 1

Anno	N. campioni esaminati	4a	4b	Negativo
2011	27	14,8%	85,2%	0
2012	23	27,7%	72,3%	0
2013	45	0	97,7	1
2014	28	0	100	0

### Considerazioni

I risultati conseguiti sono di interesse per il ruolo di bioindicatore che la Tortora, abbondante e sinantropica, può rappresentare sul territorio.

L'analisi dell'attività trascorsa predispone ad un piano di indagine che valuti l'effettiva stagionalità della mortalità così come anche la precisa localizzazione del rinvenimento sarà utile per verificare il grado di continuità del selvatico con il contesto abitativo e produttivo. Ulteriori indagini e soprattutto l'attribuzione specifica saranno necessarie per le Tricomoniasi a fronte del complesso quadro sistematico del gruppo. Relativamente ai risultati delle indagini virologiche, si conferma che in Italia il ceppo PPMV-1 è endemico nella popolazione di Tortore dal collare (*Streptopelia decaocto*) selvatiche. Considerando inoltre come i test di patogenicità degli APMV-1 hanno evidenziato un differente potere patogeno per le specie domestiche tra i diversi isolati e che il PPMV-1 può essere sporadicamente responsabile di fenomeni di *spill over* nei volatili domestici, un attento monitoraggio sanitario sulla Tortora deve continuare a essere effettuato in considerazione anche del suo possibile ruolo in contesti importanti dal punto di vista zoonotico (Rappole 2000).

### Bibliografia

- Aldous, E. W., Mynn, J. K., Banks, J. & Alexander, D. J. (2003) A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology* **32**, 239–258
- Alexander D.J., 1989. Newcastle Disease. In: American Association of Avian Pathologists: a laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kendall/Hunt Publishing Company 114-120.
- Bonfante F., C. Terregino, A. Heidari, I. Monne, A. Salviato, R. Taddei, E. Raffini, I. Capua, 2012. Identification of APMV-1 associated with high mortality of collared doves ( *Streptopelia decaocto* ) in Italy. *Veterinary Record* doi: 10.1136/vr.100448
- Bonfante F., C. Terregino, A. Heidari, I. Monne, A. Salviato, R. Taddei, E. Raffini, I. Capua, 2012. Identification of APMV-1 associated with high mortality

- of collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Veterinary Record* doi: 10.1136/vr.100448
- Campedelli T., L. Buvoli, P Bonazzi, L. Calabrese, G. Calvi, C. Celada, S. Cutini, E. De Carli, L. Fornasari, E. Fulco, G. La Gioia, G. Londi, P. Rossi, L. Silva, G. Tellini Florenzano, 2012. Andamenti di popolazione delle specie comuni nidificanti in Italia: 2000-2011. *Avocetta* 36: 121-143.
- O.I.E., 2014. Avian Influenza. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014. [www.oie.int](http://www.oie.int)
- Ceccarelli P.P., Gellini S., Casadei M., Ciani C., 2006. Atlante degli uccelli nidificanti a Forlì. Museo Ornitologico Ferrante Foschi.
- Gellini S. e P. Ceccarelli (a cura di) 2000, Atlante degli Uccelli nidificanti nelle Province di Forlì-Cesena e Ravenna. S.T.E.R.N.A - Forlì (pp.210).
- Kho C.L., Mohd-Azmi M.L., Arshad S.S., Yusoff K., 2000. Performance of an RT-nested PCR Elisa for detection of Newcastle disease virus. *J. Virol Methods*, 86 (1):71-83.
- Krysten Schuler KL, D,E. Green, A.E. Justice-Allen, R. Jaffe, M. Cunningham, N.J. Thomas, M. G. Spalding and Hon S. I., 2012. Expansion of an Exotic Species and Concomitant Disease Outbreaks: Pigeon Paramyxovirus in Free-Ranging Eurasian Collared Doves. *EcoHealth* 9, 163–170, 2012
- Lennon R. J., Dunn J. C., Stockdale J., Goodman S. J., Morris A. J., & Hamer K. C. 2013. Trichomonad parasite infection in four species of Columbidae in the UK. *Parasitol.*, 140, 1368–1376.
- Marlier D. e H. Vindevogel, 2006. Viral infections in pigeons. *The Veterinary Journal* 172: 40–51
- Panella N.A, G. Young, N. Komar, 2013. Experimental infection of Eurasian collared-dove (*Streptopelia decaocto*) with West Nile virus. *Journal of Vector Ecology*, 38 (2): 210- 214
- Rappole J. H., Derrickson S. R., & Hubálek Z. 2000. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emer. Infect. Dis.*, 6, 319–28.
- Taddei R., Terregino C., Bonfante F., Rugna G., Gelmini L., Gibelli L., Fedrizzi G., Piro R., Bonilauri P., Raffini E., Frasnelli M., 2011. Investigation on a high mortality episode in Eurasian collared-doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. 60th Wildlife Disease Association Annual International Meeting. Quebec, Canada, 14th–19th August 2011
- Terregino, C., Cattoli, G., Grossele, B., Bertoli, E., Tisato, E. & Capua, I. 2003. Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Avian Pathology* 32, 63–68.

# SVILUPPO DI UN METODO DI PROVA PER L'IDENTIFICAZIONE DI ANTICORPI SIERONEUTRALIZZANTI NEI CONFRONTI DEI *FOWL ADENOVIRUS A* NELLA FARAONA (*NUMIDA MELEAGRIS*)

Terregino C., Toffan A., Grossele B., Leardini S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 - 35020 - Legnaro (PD)*

## Summary

The Fowl adenovirus A (CELO/Phelps) is the type species of group I avian adenovirus belonging to the genus *Avianadenovirus*. This virus is often associated with specific diseases in guinea fowl, such as viral necrotizing pancreatitis. This work aims to develop a specific analytical method for the detection of neutralizing antibodies against Fowl adenovirus A in the serum of infected guinea fowls, under natural conditions. From the preliminary data so far obtained, it seems that seropositivity detected by seroneutralization assay has a short duration, it develops rapidly, is found only in slightly more than half of reared birds and never reaches very high values; the titer as well decays very quickly.

## INTRODUZIONE

Il ruolo patogeno primario dei *Fowl adenovirus A* (in passato noti come virus *CELO-Chicken Embryo Lethal Orphan*) nel pancreas di faraone (*Numida meleagris*) è stato osservato, per la prima volta a livello mondiale, in Italia da Pascucci *et al.* nel 1970. Gli autori osservarono una forma morbosa a lenta diffusione in gruppi di 9.000 e 1.200 faraone di età compresa tra 12 e 70 giorni. Nel primo gruppo la morbilità era stata del 50% mentre la mortalità del 4% e all'esame anatomo-patologico si osservava ascite, epato-splenomegalia e un pancreas aumentato di volume, di colorito giallastro con aree di varia forma ed estensione giallo-opache o emorragiche.

Charlton *et al.* (1995) descrissero un caso clinico sovrapponibile al precedente in un allevamento di 600 faraone di 21 giorni di età che mostravano anoressia, depressione ed aumento della mortalità. I colleghi americani osservarono istologicamente a livello pancreatico grave necrosi, presenza di fibrina, infiltrazione eteroflica, con numerosi corpi inclusi basofili di grosse dimensioni.

Sempre in Nord America, più precisamente in Canada, Zellen *et al.* (1989) riportarono un episodio di pancreatite da *Adenovirus* in faraone commerciali di due settimane con relativo isolamento virale in uova di pollo SPF.

Il presente lavoro ha l'obiettivo di mettere a punto un metodo analitico per la rilevazione di anticorpi sieroneutralizzanti da siero di faraone infette, in condizioni naturali, da *Fowl adenovirus A*.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Un totale di 94 sieri di faraone di diversa età e provenienza sono stati prelevati

e sottoposti ad analisi presso il Laboratorio di Virologia Speciale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Nello specifico i 94 sieri erano così suddivisi:

- 19 sieri provenienti da riproduttori di 61 settimane (Allevamento A) che non avevano mai manifestato sintomi o lesioni riferibili a pancreatite;
- 23 sieri provenienti dalla progenie di 1 giorno del sopraccitato allevamento di riproduttori (Allevamento A-0);
- 9 sieri provenienti di faraone di 37 giorni (Allevamento A-1), progenie del sopraccitato allevamento di riproduttori, che avevano presentato casi di pancreatite intorno alle tre settimane di vita;
- 16 sieri provenienti da faraone di 93 giorni (Allevamento A-2), progenie del sopraccitato allevamento di riproduttori, che avevano presentato casi di pancreatite intorno alle tre settimane di vita;
- 11 sieri provenienti di faraone di 25 giorni (Allevamento A-3; siero acuto), progenie del sopraccitato allevamento di riproduttori, che avevano presentato casi di pancreatite intorno alle tre settimane di vita
- 16 sieri prelevati nello stesso allevamento precedente a 62 giorni di vita (Allevamento A-3; siero convalescente).

#### *Isolamento e identificazione del virus*

Campioni di organo (pancreas in primis) prelevati durante l'episodio di malattia nell'allevamento A-1 ed A-3 sono stati processati per l'isolamento in colture cellulari di epatociti di embrioni di pollo (CEL), esami di microscopia elettronica e test biomolecolari (Pizzuto *et.al.*, 2010).

#### *Ricerca anticorpi sieroneutralizzanti*

I sieri sono stati testati mediante test di sieroneutralizzazione utilizzando come ceppo virale il virus isolato nell'allevamento A-1, cresciuto e titolato in CEL.

Diluizioni in base due dei sieri da testare (50 microlitri) sono state poste in doppio in pozzetti di piastre *microtitre* a fondo piatto. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 microlitri di una sospensione virale contenente 200 TCID<sub>50</sub> dell'adenovirus isolato dal pancreas delle faraone malate. Dopo incubazione per un ora a 37°C, 50 microlitri di una sospensione di CEL sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. Le piastre sono state incubate per 96 ore e osservate quotidianamente al fine di evidenziare l'effetto citopatico e valutare fino a che diluizione dei sieri in esame ci fosse neutralizzazione della crescita virale.

## **RISULTATI**

La PCR eseguita sui campioni dell'allevamento A1 e A3 prelevati in fase acuta ha evidenziato la presenza di un adenovirus aviare. Il risultato è stato confermato dall'osservazione al microscopio elettronico e all'isolamento su coltura cellulare. L'analisi della sequenza del gene hexon loop 1 ha rivelato la maggiore similarità con la specie *Fowl adenovirus A*.

Le analisi di sieroneutralizzazione eseguite sui sieri dei riproduttori hanno dato esito

negativo su tutti i 19 campioni analizzati. Sui sieri prelevati dagli animali di un giorno, 4 su 23 (17,4%) sono risultati positivi a basso titolo (1:2-1:4).

Dei sieri prelevati a 47 giorni dall'allevamento A-1 un solo siero su 9 analizzati (11%) è risultato positivo con titolo 1:8, e soli due sieri su 16 (12,5%), tra i campioni prelevati nell'allevamento A-2, sono risultati positivi (entrambi con titolo 1:8).

Dei sieri acuti prelevati nell'allevamento A3 sono risultati positivi 6 sieri su 11 (55%). I positivi avevano un titolo compreso tra 1:16 e 1:32.

Dei sieri convalescenti, prelevati 37 giorni dopo dallo stesso allevamento, sono risultati positivi 6 su 16 (circa il 40%) con titoli bassi, tra 1:2 e 1:8.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Questa indagine di campo sulla presenza di anticorpi neutralizzati verso *Fowl adenovirus A* responsabile di pancreatite nella faraona, seppur limitata nei numeri e nel periodo di osservazione, ha permesso di sviluppare un test sierologico specifico per questo agente virale.

Dai primi dati ottenuti sembrerebbe che la positività sierologica in SN per questo virus si sviluppi rapidamente, sia riscontrabile solo in una parte dei soggetti dell'allevamento coinvolto (poco più della metà), non raggiunga mai titoli elevatissimi e che il titolo decada molto rapidamente.

Ancora da chiarire il dato relativo alla debole positività osservata negli animali di 1 giorno di vita in contrasto con l'assenza di anticorpi neutralizzanti nei riproduttori. Rimane, infatti, da capire se riconducibile all'immunità materna, e di conseguenza ad una pregressa infezione dei riproduttori, o a fenomeni di cross reattività aspecifiche. Ulteriori indagini sono necessarie per comprendere meglio la cinetica anticorpale verso *Fowl adenovirus A* nelle varie classi di età e categorie produttive delle faraone.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Charlton BR, Bickford AA. (1995). Gross and histologic lesions of adenovirus group I in guinea fowl. *J Vet Diagn Invest* 7:552-554.
- Pascucci S, Quaglio GL, Maestrini N, Prati A. (1970). Pancreatite da virus CELO nella gallina faraona. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Vol. XXIV, 1970. 667-668
- Pizzuto MS, De Battisti C, Marciano S, Capua I, Cattoli G. (2010). Pyrosequencing analysis for a rapid classification of fowl adenovirus species. *Avian Pathol.* 2010 Oct;39(5):391-8.
- Zellen GK, Key DW, Jack SW. (1989). Adenoviral Pancreatitis in Guinea Fowl (*Numida meleagris*). *Avian Diseases*, Vol. 33, No. 3 (Jul. - Sep., 1989), 586-589.







# **INDICE DEGLI AUTORI**



Agnoletti F. 95, 100, 107  
Amadori M. 112

Bano L. 45, 95, 100, 107  
Barbieri I. 220  
Berto G. 95, 100, 107  
Bertoletti I. 171  
Bianchi A. 171  
Bilato D. 112  
Bonci M. 201  
Bonfante F. 100  
Bonfanti L. 145  
Brunetta R. 95  
Burzoni 45

Calini F. 57  
Camarda A. 132, 208  
Cantini F. 112  
Capello K. 107, 145  
Caputo V. 143  
Caroli A. 132, 208  
Casadio M. 152, 220  
Casagrande Proietti P. 117  
Catania S. 95, 124  
Catelli E. 162, 194, 201, 230, 248  
Cattoli G. 100  
Cecchinato M. 162, 194, 201, 230, 248  
Cecilianiani F. 139, 215  
Cesari V. 127  
Ciccarelli F. 143  
Circella E. 132, 208  
Comin D. 145  
Comitini F. 117  
Crovilla G. 162  
Cuscó Martí A. 139

Dalle Zotte A. 248  
D'Andrea S. 139  
De Biase D. 143  
De Luca Bossa L.M. 143  
De Luca S. 117  
De Vidi B. 107  
De Virgilio C. 208  
De Zan G. 100  
Di Martino G. 145  
Dipineto L. 143  
Drigo I. 95, 100, 107  
Drigo M. 162, 194  
Ducatez M.F. 162

Facchetti G. 124  
Fasoli P. 124  
Felice V. 194, 201, 230, 248  
Ferrari N. 171  
Ferrazzi V. 180  
Fiorentini L. 112, 152, 220  
Fioretti A. 143  
Francino O. 139  
Franciosini M.P. 117  
Franzo G. 162, 194

Gallazzi D. 127, 171, 180  
Gallina A. 145  
Galli R. 117  
Gavazzi L. 21  
Giacomelli S. 171  
Giardini A. 127  
Giovanardi D. 45, 107  
Giudice C. 215  
Gobbo F. 124  
Grilli G. 45, 139, 171, 180, 215  
Grossele B. 259  
Guerra P. 186

Laconi A. 162, 194, 201, 230  
Leardini S. 259  
Lecchi C. 139, 215  
Legretto M. 132, 208  
Listorti V. 194, 201, 230  
Longoni C. 248  
Lupini C. 194, 201, 230

Marin 45  
Marino M. 132, 208  
Marques A.T. 215  
Massi P. 81, 112, 152, 220, 254  
Mazzolini E. 100  
Mennonna G. 143  
Meomartino L. 143  
Mescolini G. 230  
Montesissa C. 145  
Morandini E. 45, 201  
Moronato M. L. 124  
Motta 45

Naylor C.J. 162, 194  
Nicastro M. 171

Paciello O. 143  
Pampiglione G. 245  
Pandolfo 45  
Paoli A. 112  
Parigi M. 152, 220  
Parini M. 112  
Pascoletti S. 95  
Pastò F. 71  
Pergola S. 117  
Piccirillo A. 145  
Pugliese N. 132, 208

Radeghieri P. 186  
Ragazzini 45  
Raia P. 143  
Recordati C. 248  
Restelli L. 215  
Rodio S. 124  
Romito D. 208  
Rota Nodari S. 215  
Russo E. 248

Saita M. 139  
Sánchez Bonastre A. 139  
Scaravelli D. 245, 254  
Scolari A. 31, 45  
Serafino S. 39

Taddei R. 152  
Tasoniero G. 248  
Terregino C. 100, 254, 259  
Toffan A. 259  
Tonon E. 100  
Toschi I. 127  
Tosi G. 112, 152, 220, 254  
Trevisani G. 245

Vascellari M. 100  
Vicari N. 152  
Viel L. 95, 107  
Vincio L.J. 215

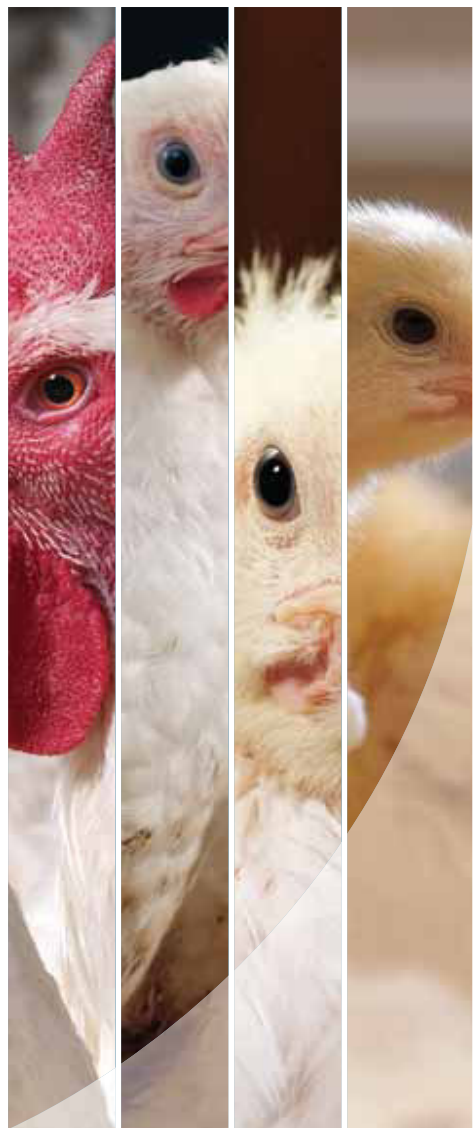
Zullo F. 180

# We add performance to your business



**HUVEPHARMA®**

We add performance to your business



**Huvepharma AD**  
5<sup>th</sup> Floor, 3<sup>a</sup> Nikolay Haytov Str.  
1113 Sofia, **Bulgaria**  
Tel.: +359 2 862-5331  
Fax: +359 2 862-5334  
e-mail: [sales@huvepharma.com](mailto: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](mailto:customerservice@huvepharma.com)

**Contatti per l'Italia:**  
[gabriele.festi@huvepharma.com](mailto:gabriele.festi@huvepharma.com)  
[paolo.mondin@huvepharma.com](mailto:paolo.mondin@huvepharma.com)



**MERIAL. UNO SGUARDO LUNGIMIRANTE**



**HVT+IBD**

**VACCINO CONTRO  
LA MALATTIA DI MAREK  
E LA MALATTIA DI GUMBORO**

**...UN PASSO DA GIGANTE  
VERSO IL FUTURO DELL'AVICOLTURA**



A SANOFI COMPANY  
www.merial.it



# Protectotype

Tutto ciò  
di cui hai bisogno  
per **proteggerti**  
dalla **Bronchite**  
**Infettiva**



MSD Animal Health S.r.l.  
Via Fratelli Cervi snc, Centro Direzionale Milano Due  
Palazzo Canova, 20090 Segrate (MI)

 **MSD**  
Animal Health





INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI : ANIMAL  
HEALTH  
PRODUCT



## > RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.



Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano 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**

Finito di stampare  
nel mese di Aprile 2015  
da La Ducale Srl - Parma