



**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria  
2016**



**LV Convegno Annuale  
Tavola Rotonda**

**Padova, 5-6 Maggio 2016 - Parma, 23 Settembre 2016**

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

**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2016**

**Padova, 5-6 Maggio 2016**

**Parma, 23 Settembre 2016**



## INDICE

Prefazione .....	pag. 21
------------------	---------

### ATTI DEL LIV CONVEGNO ANNUALE

*Forlì, 16-17 Aprile 2015*

#### INCONTRO

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

- STATO SANITARIO DELLA GALLINA OVAIOLA  
*Antonio Camarda, Elena Circella* ..... pag. 27
- STATO SANITARIO DEL TACCHINO DA CARNE  
*Diego Da Ros, Marco della Valentina* ..... pag. 35
- AL IN ITALIA NEL 2015-16  
*Calogero Terregino* ..... pag. 43

#### CONVEGNO

***“Gestione territoriale delle malattie aviarie”***

- GESTIONE DELLE MALATTIE INFETTIVE NEGLI AVICOLI: SISTEMI  
PER LA SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA  
*Paolo Calistri* ..... pag. 51
- GESTIONE DEL TERRITORIO: IL CASO DELL’INFLUENZA AVIARE  
*Lebano Bonfanti* ..... pag. 57
- LARINGOTRACHEITE AVIARE: UN ESEMPIO DI GESTIONE  
TERRITORIALE  
*Ana Moreno Martin* ..... pag. 65
- MICOPLASMI E TERRITORIO: DISEGNARE IL FUTURO  
*Salvatore Catania, Stefano Marangon* ..... pag. 73
- IL RUOLO DELLA SANITÀ PUBBLICA NELLA GESTIONE DELLE  
MALATTIE  
*Marco Farioli* ..... pag. 83

**ATTI DEL LV CONVEGNO ANNUALE**  
*Padova, 5-6 Maggio 2016*

**INCONTRO**

**“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sulle principali malattie osservate durante il 2015”**

- STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE  
*Ferdinando Battistoni* ..... pag. 95
- STATO SANITARIO DELLE GALLINE OVAIOLE 2015-2016  
*Antonio Camarda* ..... pag. 98
- LE PRINCIPALI PROBLEMATICHE SANITARIE DELLE SPECIE  
“MINORI” NEGLI ANNI 2015-16  
*Alessandro Scolari* ..... pag. 102

**CONVEGNO**

**“Infezioni emergenti e riemergenti  
nella moderna avicoltura”**

- LA CARATTERIZZAZIONE BATTERICA NELLO STUDIO DI ALCUNE  
MALATTIE EMERGENTI E RIEMERGENTI DEL POLLAME  
*Luca Bano e Giovanni Tosi* ..... pag. 107
- IS *MYCOPLASMA SYNOVIAE* OUTRUNNING *MYCOPLASMA*  
*GALLISEPTICUM*?  
*Wil J.M. Landman & Anneke Feberwee* ..... pag. 110
- STRATEGIES TO CONTROL HISTOMONOSIS IN POULTRY  
*Dieter Liebhart* ..... pag. 111

**“Un aggiornamento sull’uso del farmaco”**

- PIANO NAZIONALE PER L’USO RESPONSABILE DEL FARMACO  
VETERINARIO E PER LA LOTTA ALL’ANTIBIOTICO RESISTENZA IN  
AVICOLTURA - UN AGGIORNAMENTO  
*Rossella Pedicone* ..... pag. 117
- TERAPIA IN AVICOLTURA: UNO SGUARDO SUL FUTURO  
*Roberto Cavazzoni* ..... pag. 118

**ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA SIPA**  
**Parma, 23 Settembre 2016**  
**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

- *Alberti S.*  
E.COLI ESPERIENZE CON VACCINO VIVO ..... **pag. 123**
  
- *Banco B., Ferrari N., Cocchi L., Formenti N., Grieco V., Gallazzi D., Calligarich C., Grilli G.*  
SUI TESTICOLI SOPRANNUMERARI NEI GALLETTI DI LINEE LEGGERE ..... **pag. 125**
  
- *Bonfante F., Mazzetto E., Leopardi S., Maniero S., Salomoni A., Terregino C.*  
VALUTAZIONE DELL'EFFETTO SINERGICO DELLA COINFEZIONE DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA H9N2 E DEL CEPPO VELOGENO DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE IN GALLINE OVAIOLE IN PRODUZIONE ..... **pag. 132**
  
- *Catania S., Nardini G., Grilli G.*  
LA NUOVA FILIERA UCCELLI ORNAMENTALI: NUOVE OPPORTUNITÀ PER IL MEDICO VETERINARIO ..... **pag. 139**
  
- *Circella E., Bano L., Greco G., Marino M., Cocciolo G., D'Onghia F., Marzano G., Romito D., Camarda A.*  
BOTULISMO INDOTTO DA TOSSINA MOSAICO C/D IN UN'AREA NATURALE PROTETTA ..... **pag. 142**
  
- *Dipineto L., Pace A., De Luca Bossa L.M., Russo T.P., Varriale L., Gargiulo A., Borrelli L., Raia P., Fioretti A.*  
INDAGINE MICROBIOLOGICA SU BORRE DI RAPACI ..... **pag. 149**
  
- *Drigo I., Pascoletti S., Tonon E., Puiatti C., Bano L.*  
IMPIEGO DELL'ENDOPEP-MS PER LA DIAGNOSI DEL BOTULISMO AVIARE: RISULTATI PRELIMINARI ..... **pag. 152**
  
- *Felice V., Franzo G., Catelli E., Bonci M., Cecchinato M., Giovanardi D., Pesente P., Mescolini G., Listorti V., Silveira F., Lupini C.*  
ANALISI DELLA SEQUENZA COMPLETA DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA GENOTIPO ITA ..... **pag. 157**
  
- *Fortin A., Cecchettin K., Drago A., Monne I., Piccirillo A., Davidson I., Terregino C.*  
SVILUPPO E APPLICAZIONE DI TEST DIAGNOSTICI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE E LA CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK CIRCOLANTI IN ITALIA ..... **pag. 164**

- *Franzo G., Tucciarone C.M., Catelli E., Cecchinato M.*  
 IMPATTO DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI SULLE DINAMICHE  
 DI POPOLAZIONE DEL GENOTIPO QX DI BRONCHITE INFETTIVA E  
 SULLA FREQUENZA DEI FOCOLAI ..... **pag. 171**
  
- *Gobbo F., Moronato M.L., Flaminio B., Boscarato M., Santone C., Catania S.*  
 POSSIBILE STRATEGIA DI CONTENIMENTO DEL *MYCOPLASMA SYNO-*  
*VIAE* IN UN GRUPPO DI RIPRODUTTORI PESANTI..... **pag. 179**
  
- *Grilli G., Borgonovo F., Ferrari L., Fontana I., Tullo E., Guarino M., Ferrante V.*  
 STUDIO PRELIMINARE PER L'INDIVIDUAZIONE DI UN *EARLY WAR-*  
*NING SYSTEM* PER LA COCCIDIOSI NEL BROILER ..... **pag. 183**
  
- *Lupini C., Silveira F., Felice V., Berto G., Meini A., Franzo G., Cecchinato M.,*  
*Mescolini G., Listorti V., Catelli E.*  
 PATOGENICITÀ DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA GENOTIPO  
 ITA IN POLLI SPF ..... **pag. 187**
  
- *Mainenti M., Ochoa J.N., Rimoldi G., Adaska J.M., Vicenzoni G., Catania S.,*  
*Shivaprasad H.L.*  
 CASI AVIARI INTERESSANTI DIAGNOSTICATI AL CALIFORNIA ANI-  
 MAL HEALTH AND FOOD SAFETY LABORATORY SYSTEM DI TULA-  
 RE, NEL PERIODO MAGGIO-GIUGNO 2016 ..... **pag. 194**
  
- *Marino M., Pugliese N., Circella E., Cocciolo G., De Virgilio C., Romito D.,*  
*D'Onghia F., Camarda A.*  
 RUOLO DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NELLA PERSISTENZA DI *SALMO-*  
*NELLA GALLINARUM* IN ALLEVAMENTO..... **pag. 198**
  
- *Mescolini G., Lupini C., Bellinati L., Felice V., Listorti V., Massi P., Tosi G.,*  
*Rossi G., Pesente P., Cecchinato M., Catelli E.*  
 EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI  
 MAREK IN ITALIA NEL 2014-2016..... **pag. 205**
  
- *Moronato M.L., Gobbo F., Mainenti M., Franzo G., Cecchinato M., Catelli E.,*  
*Catania S., Martini M.*  
 INFEZIONE SPERIMENTALE CON *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE E  
*MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN POLLI DA CARNE: RISULTATI PRELI-  
 MINARI ..... **pag. 218**

- *Parigi M., Fregnani G., Caminiti A., Fiorentini L., Massi P., Tosi G.*  
ISOLAMENTO DI AVIAN NEPHRTIS VIRUS (ANV) SU UOVA EMBRIO-  
NATE DI POLLO SPF: RISULTATI PRELIMINARI ..... pag. 222
  - *Russo E., Franzo G., Tucciarone C.M., Longoni C., Cecchinato M.*  
EVIDENZE DI CAMPO DELL'EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE PER  
BRONCHITE INFETTIVA CON CEPPI MASS E QX NEI CONFRONTI  
DELL'INFEZIONE DA CEPPI DI CAMPO DI GENOTIPO Q1. .... pag. 227
  - *Scaravelli D., Tosi G., Fiorentini L., Parigi M., Caminiti A., Massi P.*  
I CORVIDI QUALI SPECIE SENTINELLA PER LE *AVIAN EMERGING DI-*  
*SEASES* IN ROMAGNA ..... pag. 233
  - *Torres C.A., Listorti V., Lupini C., Franzo G., Drigo M., Catelli E., Brandão P.E.,  
Cecchinato M.*  
EVIDENZA DI GAMMA E DELTACORONAVIRUS IN ALLEVAMENTI DI  
QUAGLIE E FAGIANI IN ITALIA ..... pag. 237
  - *Tosi G., Caminiti A., Fiorentini L., Massi P.*  
USO DI ACIDI ORGANICI A CORTA CATENA E RIDUZIONE DELLE LE-  
SIONI PLANTARI NEL BROILER: RISULTATI PRELIMINARI ..... pag. 246
  - *Tucciarone C.M., Franzo G., Berto G., Drigo M., Cecchinato M.*  
CINETICA DI CEPPI VACCINALI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE IN-  
FETTIVA E INTERAZIONI CON CEPPI DI CAMPO E METAPNEUMOVIRUS  
AVIARE IN ALLEVAMENTI DI BROILER ..... pag. 252
  - *Zandonà L., Agnoletti F., Puiatti C., Pozzobon G., Ceruti R., Giovanardi D.,  
Bano L.*  
FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI DI *RIEMERELLA ANATIPESTIFER*  
ISOLATI IN ALLEVAMENTI COMMERCIALI DI TACCHINI E POLLI DA  
CARNE ..... pag. 261
- INDICE DEGLI AUTORI** ..... pag. 269

# INSTALL THE ULTIMATE ANTIVIRUS



**La soluzione definitiva alla Newcastle Disease.**

- **Stop al ricircolo virale.**
- **Stop alle reazioni post-vaccinali.**
- **Protezione massima.**



# LINCOFARM S

Lincomicina 250 mg/ml



## CENTRA IL TRATTAMENTO

**L'UNICA FORMULA LIQUIDA  
ad ELEVATA CONCENTRAZIONE**



**Soluzione Orale - Da oggi anche per AVICOLI**

**POLLI - OVAIOLE - FARAONE - ANATRE - OCHE - QUAGLIE - FAGIANI - STARNE - PERNICI - PICCIONI**

 **chemifarma** S.p.A.  
INDUSTRIA FARMACUTICA VETERINARIA

Via Don Eugenio Servadei, 16 - 47122 Forlì (FC) - ITALY  
Tel. +39 0543 796464 - Fax +39 0543 796479  
e-mail: info@chemifarma.it - [www.chemifarma.it](http://www.chemifarma.it)



## NE È PASSATO DI TEMPO.

100 anni. È un periodo davvero lungo per comprovare i nostri valori,  
le nostre innovazioni, il nostro servizio e i nostri riproduttori.  
Grazie per essere la parte più importante del nostro successo.



UN SECOLO DI PROGRESSI

# HALAMID

IL DISINFETTANTE UNIVERSALE

## Halamid®: la soluzione che non trova resistenze.

La biosicurezza inizia da una disinfezione efficace.

Halamid®, in polvere concentrata e **facilmente dissolvibile** in acqua, si è dimostrato efficace contro numerosi virus e batteri. Halamid® distrugge i microrganismi patogeni, generando un'ossidazione irreversibile che **non induce resistenza batterica**.

Pratico e **versatile**, si adatta alle diverse necessità di applicazione, dall'irrorazione per vaporizzazione alla nebulizzazione e alla termo condensazione.

**Non corrosivo**, biodegradabile, è facilmente risciacquabile e si mantiene **stabile** anche in soluzione stock, pronta all'uso.

*Avere cura è molto più che curare.*

Presidio Medico Chirurgico - n. reg. 3883 - Disponibile in confezioni da 1 kg a 1.000 kg

Dox-al Italia S.p.A.  
Via Mascagni, 6 - 20884 Sulbiate (MB) Italy  
Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400  
info@doxal.com



dox-a

Nutri

dox-a

Hi-tech



dox-al

Pharma

# LA SOLUZIONE ELANCO A 360°

AviPro.  
SALMONELLA VAC E

AviPro.  
SALMONELLA VACT

AviPro.  
SALMONELLA DUO

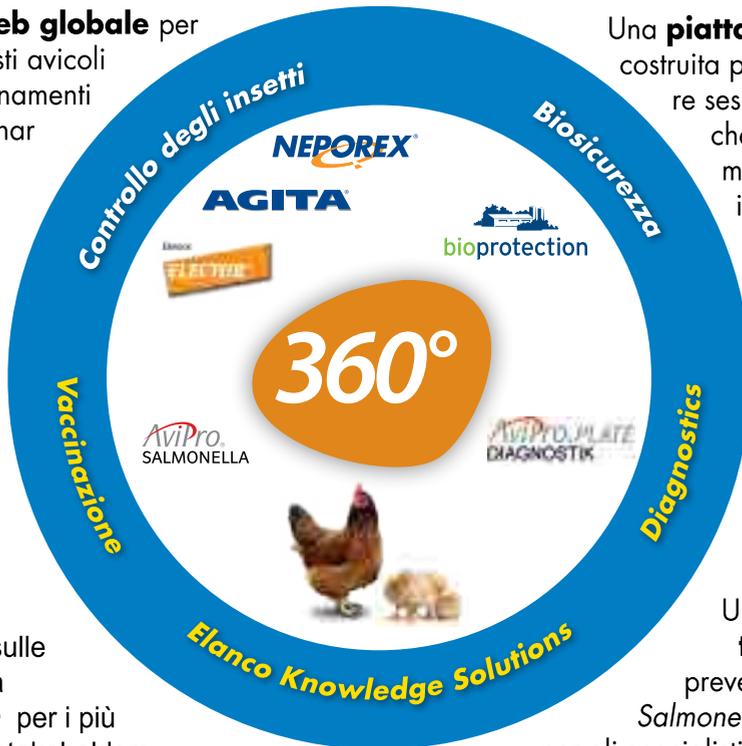


Salmonella 360° .com

Un **sito web globale** per gli specialisti avicoli con aggiornamenti e live webinar

Salmonella 360° Webinar

Una **piattaforma live** costruita per condividere sessioni scientifiche guidate dai migliori esperti internazionali sul controllo e la prevenzione della *Salmonella*



**Seminari** sulle infezioni da *Salmonella* per i più importanti stakeholders

Salmonella 360° Seminar

Un **bollettino tecnico** sulla prevenzione della *Salmonella* sviluppato per gli specialisti in avicoltura

Salmonella 360° Bulletin

Riservato ai Sigg. Medici Veterinari e Farmacisti

**Elanco 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 ITLAYAVP00001

**Elanco**

# 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](http://www.fatro.it) - e-mail: [info@fatro.it](mailto:info@fatro.it)



*la salute animale per la salute dell'uomo*

# Salite a bordo di HIPRACOX®

Vaccino vivo contro la coccidiosi nei polli, in sospensione orale per nebulizzazione.



**Il vostro piano di rotazione  
annuale contro la coccidiosi**



**HIPRACOX BROILERS®**, Sospensione orale per polli. **Composizione per dose (0,007 ml):** *Eimeria acervulina* ceppo 003, 300-390 oocisti sporulate; *Eimeria maxima* ceppo 013, 200-260 oocisti sporulate; *Eimeria mitis* ceppo 006, 300-390 oocisti sporulate; *Eimeria praecox* ceppo 007, 300-390 oocisti sporulate ed *Eimeria tenella* ceppo 004, 250-325 oocisti sporulate. **Indicazioni:** polli da ingrasso: per un'immunizzazione attiva al fine di ridurre la colonizzazione intestinale, le lesioni intestinali e i segni clinici di coccidiosi causata da *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* ed *Eimeria tenella*. **Via di somministrazione:** orale, mediante nebulizzazione a goccia grossa. Dopo la vaccinazione, collocare i polli sul terreno con lettiera e continuare le consuete pratiche di produzione. Utilizzare unicamente l'agente colorante fornito. **Posologia:** polli da ingrasso: 1 dose (0,007 ml di vaccino + 0,020 ml di agente colorante)/pulcino di 1 giorno di età. Preparare dapprima la soluzione dell'agente colorante. È necessario un contenitore adeguato, pulito e con capacità sufficiente (rispettivamente da 287 ml o 1.435 ml di capacità per ciascun flacone da 1.000 o 5.000 dosi). Aggiungere dell'acqua a temperatura ambiente (rispettivamente 260 ml o 1.300 ml di acqua per ciascun flacone da 1.000 o 5.000 dosi). Agitare energicamente il flacone dell'agente colorante. Aggiungerlo all'acqua e agitare delicatamente sino ad ottenere una soluzione omogenea. Agitare energicamente il flacone di vaccino. Aggiungerlo alla miscela e agitare delicatamente sino ad ottenere una sospensione omogenea. Collocare la sospensione vaccinale preparata nel dispositivo. La sospensione vaccinale viene somministrata mediante nebulizzazione, erogando 25 ml per ogni 100 polcini di 1 giorno di età. Le dimensioni della goccia devono essere  $\geq 100 \mu\text{m}$ . **Reazioni avverse:** nessuna. **Tempo di attesa:** 0 giorni. **Precauzioni speciali:** i polli devono essere allevati rigorosamente su terreno con lettiera. Al fine di ridurre le infezioni, occorre eliminare la lettiera del terreno e pulire accuratamente il materiale usato tra i diversi cicli di produzione. Non possono essere usati coccidiostatici o altri farmaci ad azione anticoccidica nel mangime o nell'acqua da bere per almeno le 3 settimane successive alla vaccinazione dei polli, poiché ciò potrebbe inibire la corretta replicazione delle oocisti vaccinali e, conseguentemente, lo sviluppo di un'immunità adeguata. Inoltre, verrebbe limitato l'incremento della protezione prodotto dalle infezioni dotate alle oocisti. Conservare il vaccino ad una temperatura compresa tra +2 e +8 °C, evitandone il congelamento. Conservare l'agente colorante ad una temperatura inferiore a +25 °C. Non congelare. Il vaccino deve essere usato immediatamente dopo l'apertura e le dosi non utilizzate devono essere scartate. Il periodo di validità dopo la dissoluzione non deve superare le 10 ore. **Presentazione:** flacone da 1.000 dosi + agente colorante. Flacone da 5.000 dosi + agente colorante. **Numero dell'autorizzazione all'immissione in commercio:** A.I.C. nr. 103965024, A.I.C. nr. 103965012, A.I.C. nr. 103965087 e A.I.C. nr. 103965075. **Titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio:** LABORATORIOS HIPRA, S.A., Avda. la Selva, 135, 17170 Amer (Girona) Spagna Tel.: (+34) 972 430660 - Fax: (+34) 972 430661. **Rappresentante locale:** Hipra Italia, S.R.L., Via Franciacorta n° 74, 25038 Rovato (Brescia), ITALIA. **Condizioni di fornitura:** medicinale veterinario soggetto a prescrizione. Usare i medicinali responsabilmente.

**Hipra Italia, S.R.L.**  
Via Franciacorta n° 74  
25038 Rovato (Brescia)  
ITALIA

Tel.: (+39) 030 7243 025  
Fax: (+39) 030 7700 881  
italia@hipra.com  
www.hipra.com

# We add performance to your business



**HUVEPHARMA®**

We add performance to your business



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

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

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



VETERINARY PHARMACEUTICALS  
AND VACCINES  
MEDICINA

vaXXinova

## POULTRY

Full range of freeze dried, frozen live, inactivated viral and bacterial vaccines to cover mainly all poultry pathologies.







Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2016 sono realizzate grazie al contributo di:

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



## PREFAZIONE

Quest'anno si è insediato il nuovo Consiglio direttivo che manterrà l'incarico per i prossimi 3 anni. Nel ringraziare i consiglieri uscenti, che ci hanno accompagnato per ben 6 anni nella gestione della nostra Società, colgo l'occasione per confermare la continuità progettuale che ci ha contraddistinti negli ultimi anni come la partecipazione alla stesura, insieme ad Unaitalia, del Piano nazionale per l'uso responsabile del farmaco veterinario e per la lotta all'antibiotico-resistenza in avicoltura.

Ma, come si conviene, il nuovo consiglio è ricco di idee e di innovazioni. La prima innovazione è sicuramente quella di dividere l'incontro annuale separando il Convegno nazionale, in cui sono previste solo relazioni ad invito, dalle comunicazioni scientifiche dei soci che verranno effettuate in un'apposita giornata. L'intento è quello di approfondire l'aspetto scientifico dell'incontro senza per questo comprimere l'attività scientifica dei soci, soprattutto quelli più giovani, che hanno tutto il diritto di presentare il frutto delle loro ricerche.

A tale scopo il 55° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, che si è tenuto a Padova, mantiene la classica impostazione con le relazioni sullo stato sanitario dell'avicoltura italiana nel 2015 seguite da un aggiornamento su *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.*; l'assemblea dei soci conclude la giornata. Il giorno dopo l'argomento principale del convegno ha come obiettivo dare delle indicazioni su alcune patologie emergenti e riemergenti nell'avicoltura europea. Questa giornata vede impegnati, come relatori, sia colleghi italiani che ricercatori provenienti da Olanda, Belgio e Austria. Questo momento di confronto vede riprendere in considerazione patologie sempre attuali quali i Mycoplasmi e le enteriti batteriche e quelle più rare come l'Histomoniasi.

Il secondo incontro, che si terrà a Parma, vedrà impegnati i colleghi italiani che presenteranno i risultati delle loro ricerche. Dagli atti qui allegati si nota sempre di più come i patologi aviari italiani siano impegnati costantemente nella ricerca raggiungendo eccellenze scientifiche riconosciute anche all'estero.

Anche questo incontro, al pari di quelli passati, si 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.

Nella speranza che anche questa nuova formula congressistica susciti l'interesse che merita, colgo l'occasione per salutare e ringraziare tutti i soci che ci appoggiano nelle nostre iniziative.

Milano, 14 luglio 2016

*Dott. Guido Grilli*  
*Presidente SIPA*



# ATTI DEL LIV CONVEGNO ANNUALE

Forlì, 16-17 Aprile 2015



## **INCONTRO**

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



**ANTONIO CAMARDA  
ELENA CIRCELLA**

**Stato sanitario della gallina ovaioia**

**STATO SANITARIO DELLA GALLINA OVAIOIA**

Rapporto di Stato Sanitario della Gallina Ovaioia  
 elaborato da: **Roberto Di Francesco, Andrea Di Cristofano**  
 con il contributo di: **Roberto Di Francesco, Andrea Di Cristofano, Roberto Di Francesco**  
 Edizione: **2014**  
 ISBN: **978-88-905-1111-1**

**LIV Congresso Annuale della Società Italiana di Patologia Aviaria**

- ▶ Malattie Batteriche
- ▶ Malattie Virali
- ▶ Malattie Parasitarie
- ▶ Macrotossicose
- ▶ Altre Problematiche

**MALATTIE AD EZIOLOGIA VIRALE**

© 2014 SIPA - Società Italiana di Patologia Aviaria

**BRONCHITE INFETTIVA AVIARE**

Segni clinici tipici di forme  
 respiratorie a tipo febbre  
 bronchiale.

La malattia è dovuta a un virus  
 della famiglia Paramyxoviridae in  
 particolare al suo tipo di  
 influenza paramyxovirale.

Sintomi:

- IP
- OD
- COB
- AMI
- GI

© 2014 SIPA - Società Italiana di Patologia Aviaria

**Bronchite infettiva**

Tra le forme cliniche segnalate

- Forme asintomatiche
- Forme respiratorie
- Falso Oculo
- Intossicologia

La trasmissione avviene attraverso  
 occasionalmente anche gli affetti soggetti  
 sani.

© 2014 SIPA - Società Italiana di Patologia Aviaria

**Patologie ad eziologia virale**

**Bronchite infettiva**

- ▶ Segni clinici simili a quelli  
 di altre malattie virali
- ▶ Con caratteristiche tipiche
- ▶ Con sintomatologia  
 respiratoria
- ▶ Con  
 caratteristiche  
 simili

© 2014 SIPA - Società Italiana di Patologia Aviaria

## Laringotracheite infettiva



## Laringotracheite infettiva

Segnalazioni in diminuzione

La malattia resta comunque presente sul territorio nazionale

È segnalata

Forme subcliniche

Forme respiratorie tipiche

In associazione a

• Mycoplasma spp

• Bronchite infettive



## Malattia di Marek

Malattia segnalata in Emilia Romagna

Neuropatia periferica  
successiva a reazione vaccinale  
(Ripiena) da eccesso di vaccino

Percentuali di soggetti colpiti

> 0,5 - 1-2%



## Metapneumovirus

Segnalati 2 casi in Lombardia

Europa interessata

• Sierotipo B

Un caso in galline di 30  
settimane in Veneto

Casi di Malattia della testa  
gofita in alcuni gruppi di esemplari  
nati in Campania



## Diftero vaiolo

scantinato occasionalmente e solo  
allevamenti di piccole dimensioni  
(sue) in

□ Sicilia (forma crostacea)

□ Puglia (forma crostacea)

□ Campania (forma difterica)

□ Trentino (forma crostacea)



## Influenza Aviare

NON SEGNALATI CASI DI  
INFLUENZA AVIARE (IPA)  
E HPAI NELL'ULTIMO  
ANNO SCOLARE







## Artropatia Amiloide

Principale causa di amiloidosi nei reattori di grandi reattori di energia.

Asiomaticamente simmetrica, poliartrite articolare non erosiva.

**Verde:** un reattore ad pressione di 14 MW.

**Lumbaria:** un reattore in pressurizzato.

**Stadio Romagnolo:** un reattore in pressurizzato con un reattore GCR.

Insediamenti nucleari di Dimensione Media.

Cosa accadrà quando non potremo avere più efficienti tecnologie di conversione di reattori?



11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM

## Altre forme Batteriche

**Coliformi batterici**

**Staphylococcus aureus**

Spesso associato ad infezioni. Anticorpi anti-Amiloidosi con Staphylococcus aureus.

11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM

## Gallibacterium anatis

isolamento segnalato in alcuni episodi da IZS - Forlì, su pollastre ed ovaiole in deposizione

Per Gallibacterium anatis è un reattore di energia nucleare.

Pathogenesis of Gallibacterium anatis is a natural infection model for the Kaposi's sarcoma. 1. Pathology and drug in egg production are the predominant effects in specific pathogen free system.

What? L'altro modo di fare.

Per Gallibacterium anatis è un reattore di energia nucleare.

Pathogenesis of Gallibacterium anatis is a natural infection model for the Kaposi's sarcoma. 1. Pathology and drug in egg production are the predominant effects in specific pathogen free system.

What? L'altro modo di fare.

11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM

## Gallibacterium anatis

Asiomaticamente simmetrica, poliartrite articolare non erosiva.

L'altro modo di fare.

Staphylococcus aureus

Coliformi batterici

Competenza del reattore



Insediamenti nucleari di Dimensione Media.

11/01/2011

11/01/2011

11/01/2011

## Malattie ad eziologia parassitaria



11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM

## Dermanyssus gallinae

**VERA E PROPRIA EMERGENZA SANITARIA**

Le nuove tipologie di allevamento hanno amplificato il problema?

Inefficacia dei trattamenti

Malattie infettive concomitanti

**TIFOSSI AVARE?**



11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM 11/01/2011 11:00:00 AM

## Dermanyssus gallinae

Conoscenza della zoonosita di base della pulce della Gallina (Lacerta) e la sua gestione in allevamenti COOP. L'obiettivo è quello di dare ai clienti informazioni utili sulla zoonosita di Dermanyssus gallinae.

Coordinatore del progetto: Prof. Vito Scarpato

Autore: Vito Scarpato  
Autore: Vito Scarpato  
Autore: Vito Scarpato (S.M.P.)

INFORMAZIONE  
INFORMAZIONE  
INFORMAZIONE

Improving current understanding and research for sustainable control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (SCRM)



## Dermanyssus gallinae



INFORMAZIONE  
INFORMAZIONE  
INFORMAZIONE

## Malattie Parassitarie

### ASCARIDIOSI E CAPILLARIOSI



### TENIASI



### COCCIDIOSI



## Micotossicosi

Microlesioni angustate nelle pareti  
per le sue pareti forti

Classe: micotossicosi di tipo  
Pneumonia (gialla) e  
Pneumonia (rossa e bianca)

Regime: micotossicosi di tipo  
(OOC, TE, Zoonosici)

Classe: micotossicosi  
Classe: micotossicosi  
Classe: micotossicosi



Questa relazione non sarebbe stata possibile senza l'aiuto di:

- |              |  |
|--------------|--|
| 1. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 2. Edizione  | Coordinatore del progetto: Vito Scarpato |
| 3. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 4. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 5. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 6. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 7. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 8. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 9. Edizione  | Autore: Vito Scarpato                    |
| 10. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 11. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 12. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 13. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 14. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 15. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 16. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 17. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 18. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 19. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |
| 20. Edizione | Autore: Vito Scarpato                    |

INFORMAZIONE  
INFORMAZIONE  
INFORMAZIONE

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**



**DIEGO DA ROS,  
MARCO DELLA VALENTINA**  
**Stato sanitario del tacchino da carne**

## Stato sanitario del tacchino da carne

D. Di Rosa  
M. Della Ventura  
SIM 2015

## Principali problematiche

- Enteriti
- HPAI
- TRT
- FAV2-HE
- POX
- MG
- M5
- E.coli
- Pasteurella
- Riemerella
- Ort

## Patologie enteriche

### Virus singoli o associate

Rotavirus, Adenovirus,  
Circovirus, Astrovirus

### Batteriche

E. Coli, Salmonella, Clostridium,  
Staphylococcus, Streptococcus

### Parassitari

Protozoi flagellati (Trichomonas, Histomonas), Helicobacter gallinarum,  
Heterakis, Colibacillus,  
Protozoi non flagellati  
Cistice

## Patologie enteriche



## TRT

- Endemica
- Sottocostale 8-10% Sottocostale A < 5%
- Vaccinazione attiva in incubazione
- Frequente forma tardiva (70-80 gg) spesso correlata alla dose batterica



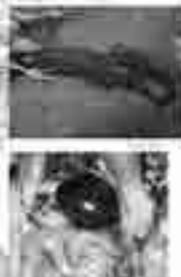
## POX

- Endemica nel periodo estivo e autunnale
- Forma cutanea più comune
- Vaccinazione per evitare zingari e cicli nei veterinari



## Enterite Emorragica

- Colpisce i tacchini al di sopra delle 4 settimane caratterizzata da depressione, feci emorragiche e mortalità variabile da 0,5% al 90% a seconda della virulenza del ceppo
- In Italia è endemica segnalata per lo più in forma subclinica con immunodepressione
- Predisposizione a forme batteriche secondarie



## Enterite Emorragica

- In altri paesi europei che producono tacchini è ammesso l'uso del vaccino vivo attenuato
- La vaccinazione con uno spunto riduce l'entità delle lesioni ma non l'immunosoppressione
- Mortalità media più elevata
- Aumento dell'utilizzo e del costo del farmaco



## Enterite Emorragica

- Attualmente è in corso un monitoraggio sulla circolazione del virus HEV negli allevamenti di tacchini da carne
- Valutazione epidemiologica su vaccinati e non vaccinati con prelievi a 4 diversi stadi di età
- Si auspica che i risultati possano indurre le Aziende Farmaceutiche a ritenere "conveniente" la presentazione di un dossier al fine di ottenere la registrazione di un vaccino vivo anche in Italia

## Micoplasmosi

- numerosi casi di *M. gallisepticum* e *M. synoviae*
- principalmente in soggetti di età superiore alle 10 settimane
- segnalati casi in femmine di 30-88 di età
- terapia: doxiciclina e macrolidi



## Micoplasmosi

- La presenza di focolai è spesso determinata da distanze nella gestione delle biosicurezze, elevata densità degli animali (in determinate zone) e la promiscuità con altre specie avicole
- Pulizia e disinfezione delle aziende
- Attenzione a spostamenti di persone, rifiuti e animali morti



## Colibacillosi

- Patologia condizionata (stress ambientali, immunosoppressione)
- Patogenicità spiccata per l'isolato respiratorio con galtoniti e setticemia

### Colisetticemia

- molti isolati nei animali in buona salute
- Epato e spleno megalia con necrosi splenica e anemia di tipo che progressiva

### Forma cronica

- associata con presenza di infertilità, emorragie gastroenteriche e diarree e pericarditi fibrosi

Ceppi multiresistenti con sensibilità limitata a pochi principi attivi

## Istomoniasi

- Casi sporadici
- Impossibile il trattamento elevata mortalità
- Trattamento con amminociclina in acqua dà bene nella fase iniziale
- Fondamentale l'eliminazione della lettiera e trattamenti specifici contro gli ospiti intermedi (lumache, ascari, alphithobius)



## Aspergillosi

- Segnalata in soggetti di tutte le età
- In diminuzione forse a causa dell'estate molto piovosa
- Incubatoio
- Lettiere, Ventilazione
- Rappresenta ancora una delle maggiori cause di eliminazione delle carcasse al macello

## Aspergillosi

Apparato respiratorio

Meningite



## Colera

- Medio aumento dei casi sul in Centro Italia
- Colpi asimmetrici 70 e 120 kg con polmoniti monolaterali
- Edema
- Le ternone sembrano rispondere



## Mal Rossino

- Qualche caso
- Infezione acuta fulminante che colpisce singoli soggetti del gruppo
- Terapia con amoxiciclina



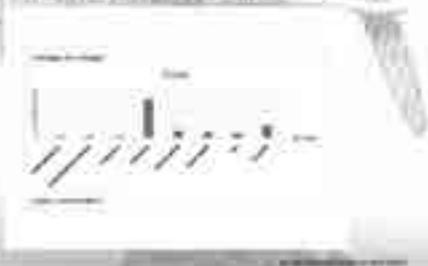
## ORT

- Numerosi episodi negli ultimi anni
- Isolata più frequentemente nel pollo e nel tacchino



## ORT

- Segnalata in soggetti tra i 40 e gli 80 gg con firma respiratoria, mortalità elevata e depressione del servizio
- Colpisce prevalentemente l'apparato respiratorio



## ORT

- Lesioni ematologiche limitate nei sacchi aerei associata a gravi polmoniti acute

Riferenza:

- Localizzazione polmonare con emorragici



## ORT

- La sierologia evidenzia numerose positività probabilmente dovute all'elevata diffusione
- Sensibile a doxiciclina - sulfamidici - tetracicline
- Spesso risposta alle terapie non soddisfacente
- Le forme cliniche devono essere confermate dall'isolamento con sempre facile in caso di ORT



## Riemerella anatipestifer

- Patologia ciclica
- Già segnalata nel 2012 e 2013 numerosi casi nella seconda metà del 2014 e inizio 2015



## Riemerella anatipestifer



## Riemerella anatipestifer

- Colpi animali tra i 40 e 100 gg ma si possono verificare anche forme tardive
- Trasmissione:
  - via respiratoria da soggetti infetti
  - per ingestione di acqua e mangime contaminati
  - vettori artropodi (zanzare)
  - via transcutanea attraverso traumi alle podali
- Resistenza:
  - 4-5 gg a temperatura ambiente
  - 13 gg nell'acqua
  - 27 gg nella lettiera del fazzoletto



## Riemerella anatipestifer

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

## Riemerella anatipestifer

- Il periodo di incubazione è di 3-5 gg
- Mortalità elevata
- Sintomatologia respiratoria con tosse e stinchi
- Mortalità improvvisa e depressione del settore. Sintomatologia nervosa con incoordinazione della testa. Paralisi delle ali e delle zampe, ribaltamento laterale

## Riemerella anatipestifer

- Mortalità variabile (2-15%) a seconda dell'età specie se aggravata da altre patologie (colibacillosi, E. coli)
- Segnalati casi di mortalità fino al 10-12%
- Terapia: penicilline (amoxicillina e ampicillina) – sulfamidici - rifamicine
- Somministrazione acqua da bere associata a interventi per via parenterale

## Riemerella anatipestifer

### Esame Anatomopatologico

- Polmonite interstiziale
- Aerodivocità e peripneumonia
- Miocardite e ipertrofia
- Meningite

## Riemerella anatipestifer

- Buona resistenza a successive infezioni
- Molto più frequenti la formazione di soggetti con difficoltà di deambulazione e che tendono a un decubito prolungato sul lato e sul cocchio
- La sintomatologia è detta "kinky back" associata a spondilite

## Riemerella anatipestifer



Lesioni anatomopatologiche non specifiche osservate istologicamente dal laboratorio

## Riemerella anatipestifer

- Buone pratiche di conduzione e di igiene dell'allevamento
- Evitare il sovraffollamento
- Evitare venti termici o fra scarsa ventilazione
- Strategie di intervento: vaccinazioni nelle aree più a rischio
- Esistono 21 sierotipi
- Attualmente il più diffuso in Italia è il Sierotipo 2
- Resistenza acquisita e sierotipo specifica
- Opportuno l'utilizzo di vaccini contenenti i sierotipi omologhi circolanti o approntare un vaccino stabilogeno

## Caso Clinico

- Allevamento localizzato in Riviera Ligure
- Femmine BUI di 40 gg
- Gravi forme enteriche a partire dalla prima settimana con forte peggio
- Trattamento ripetuto con Amoxicillina
- A 40 gg compare improvvisa di soggetti a terra con difficoltà di deambulazione e che si agitano con le ali. Forte tachicardia, cute fragile e furtive ipomane del fegato:
- Trattamento con glucosio di E&S 10
- Durata circa un mese con graduale remissione e mortalità dovuta a soggetti di scarto da eliminare

## Caso Clinico

- Analisi del mangime: escluso carenze minerali vitaminiche o eccesso di fosfori
- Analisi dell'acqua: modifica delle caratteristiche organolettiche
- Riviera ligure: rottura delle falde acquifere dovute a lavori per autostrada
- trattamento con prodotti a base di perossido di idrogeno: allacciamento con acquedotto e vitidore: trattamento con prodotti a base di perossido di idrogeno
- nessun altro caso

## Caso Clinico

- Allevamento localizzato in Val d'Aipone (VR)
- Tacchini maschi di 40 gg
- Quadro clinico identico al precedente suamento nel periodo estivo 2013 e 2014 con medesimo trattamento e decorso
- L'allevamento utilizza l'acqua più A sorgenti diverse abbastanza superficiali che si mescolano in un unico vascone di raccolta
- Analisi dell'acqua: non abbiamo un raffronto tra estate e inverno. Differenza significativa tra due prelievi fatti a distanza di 15 giorni e tra le diverse sorgenti: per quanto riguarda la presenza di E. coli e Coliformi (UFC/100 ml)
- Trattamento con biossido di cloro
- Trattamento dell'acqua su tutti gli allevamenti

## Igiene dell'acqua

- parametro trascurato nell'allevamento del tacchino
  - contenuto in minerali (Fe, Mn, Ca, Mg)
  - contaminazione microbica
  - presenza di impianti obsoleti
- potenziale riduce al di sopra di 650 cm: effetto sanificante
- Prodotti a base di cloro (ipoclorito di sodio, biossido di Cloro) e perossido di idrogeno
- Attenzione a:
  - Trattamenti terapeutici concomitanti
  - Sottoprodotti della distillazione (ammoniaca, derivati alogenati)

## Ringraziamenti

Dott. Marco Della Valentina (gruppo Amadori)  
Dott. Luigi Giavazzi (gruppo Amadori)  
Dott. Giovanni Ortolani (gruppo AMI)  
Dott. Paolo Cappucco (gruppo Amadori)  
Dott. Stefano Serbelloni  
Dott. Salvatore Citrona (L2SVL)  
Dott. Giovanni Tei (L2SRB)





**CALOGERO TERREGINO**

**Al in italia nel 2015-16**

Calogero Terreggini

## AI in Italia nel 2015-16

CIPE

## Situazione prima dell'estate 2015

- Situazione "buona" di LPAI (H6N8) in "Italia" in area geografica (EU) circoscritta (area "E" - prima stagione più favorevole)
- Situazione "buona" di LPAI (H6N8) in provincia di Brescia in "Italia" (area "E") circoscritta (area "E")
- Situazione "buona" di LPAI (H6N8) in provincia di Padova in "Italia" (area "E") circoscritta (area "E")



## H6N8

- Primo caso in sezione da carne di Fradello (PD), successivamente in Lombardia è stato rinvenuto il quaglia Marco a Gussafong (Lugano) e in un allevamento multipace in provincia di Mantova (Labbate).
- Da settembre a dicembre, circa 15-20 focolai in provincia di Verona in focolai da carne.
- Dicembre, un caso in focolai da carne in Emilia-Romagna.



## Sintomatologia riscontrata in campo nei focolai da H6N8

- Problemi respiratori
- Mutanza al movimento, affaticamento
- Le convulsioni cliniche e la mortalità sono state più gravi in concomitanza con altri patogeni quali *E. avianarum*, *E. multicauda*, *Mycoplasma*, *E. coli*, *HEV*, *AMV*
- In molti casi all'esordio dell'epidemia e prima dell'uso del vaccino si è registrato un significativo aumento della mortalità in pochi giorni

## IVPI dell'H6N8

Parametro	Numero di esecuzioni (dalla 1ª alla 10ª settimana)										Media
Normali	0	0	13	4	0	1	17	3	15	10	10x0 + 0
Dei	1	5	2	2	0	1	1	1	1	1	10x1 + 0
Severamente aff.	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1x1 + 0
Totale	0	5	15	6	1	2	1	1	1	1	10x0 + 10x1 + 1x1 = 17
											IVPI = 1.03

## IVPI dell'H6N8, ripetizione con 15 soggetti

Parametro	Numero di esecuzioni (dalla 1ª alla 10ª settimana)										Media
Normali	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10x0 + 0
Dei	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10x0 + 0
Severamente aff.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1x1 + 0
Totale	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10x0 + 10x0 + 1x1 = 1
											IVPI = 0.98

## Infezioni sperimentali

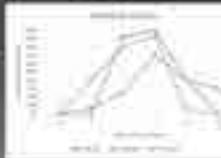
**Quanti**  
 Numero animali dopo il primo trattamento

**Quanti guariti**

Substrato di legno macinato e sabbia di fiume (100 g) per animale  
 nella prima settimana di trattamento

**Quanti**

Da immunità naturale, da vaccino, da primo  
 trattamento con mangimi (prima o prima del)



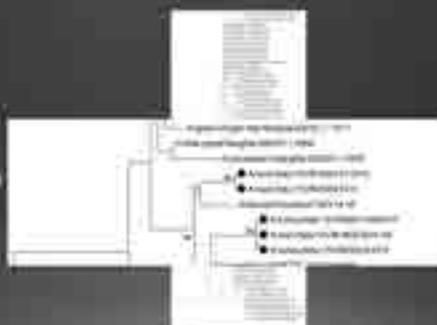
## Focolai di NAI in inverno (2015) - Emilia-Romagna

Provincia	Spazio aziendale	Localizzazione	Area contaminata	Area di controllo	Stato
Bologna	S.p.A. S.p.A.	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
		Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
Modena	S.p.A. S.p.A.	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
		Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%

## Focolai di NAI in inverno (2015) - Lombardia

Provincia	Spazio aziendale	Localizzazione	Area contaminata	Area di controllo	Stato
Brescia	S.p.A. S.p.A.	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
		Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
Mantova	S.p.A. S.p.A.	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
		Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%

similitudine  
 ecologica degli  
 focolai



## Misure di controllo (DD MS 10/12/2015)

- Controlli straordinari di copertura entro il fine dell'anno negli allevamenti di suino (2-30 gg) da carne in Emilia Romagna, Veneto, Lombardia, Friuli V.G., Marche, Umbria e Piemonte
- Controlli preventivi nelle 98 A. Igiene di FERA FC e in 39 precepieri (altre provincie regionali)
- Investimento europeo di 500.000.000 in favore dell'industria nazionale

## Focolai LPAI 2016

Provincia	Spazio aziendale	Localizzazione	Area contaminata	Area di controllo	Stato
Brescia	S.p.A. S.p.A.	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
		Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
Mantova	S.p.A. S.p.A.	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%
		Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	Località S. Maria (C.S. S. Maria)	100%

## H5N1 HPAI 2005



## Morali

01/01/2005	1
02/01/2005	1
03/01/2005	1
04/01/2005	1
05/01/2005	1
06/01/2005	1
07/01/2005	1
08/01/2005	1
09/01/2005	1
10/01/2005	1
11/01/2005	1
12/01/2005	1
13/01/2005	1
14/01/2005	1
15/01/2005	1
16/01/2005	1
17/01/2005	1
18/01/2005	1
19/01/2005	1
20/01/2005	1
21/01/2005	1
22/01/2005	1
23/01/2005	1
24/01/2005	1
25/01/2005	1
26/01/2005	1
27/01/2005	1
28/01/2005	1
29/01/2005	1
30/01/2005	1
31/01/2005	1

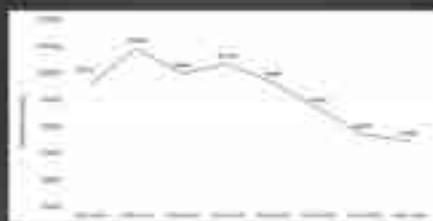
## Mortalità



## Produzione uova settimanale

01/01/2005	1000
02/01/2005	1000
03/01/2005	1000
04/01/2005	1000
05/01/2005	1000
06/01/2005	1000
07/01/2005	1000
08/01/2005	1000
09/01/2005	1000
10/01/2005	1000
11/01/2005	1000
12/01/2005	1000
13/01/2005	1000
14/01/2005	1000
15/01/2005	1000
16/01/2005	1000
17/01/2005	1000
18/01/2005	1000
19/01/2005	1000
20/01/2005	1000
21/01/2005	1000
22/01/2005	1000
23/01/2005	1000
24/01/2005	1000
25/01/2005	1000
26/01/2005	1000
27/01/2005	1000
28/01/2005	1000
29/01/2005	1000
30/01/2005	1000
31/01/2005	1000

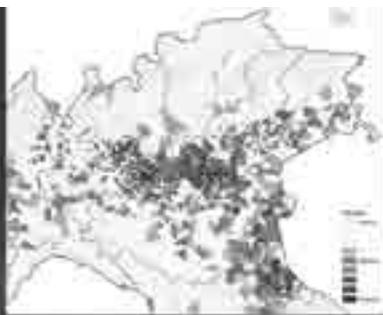
## Produzione uova settimanale



## Consumo settimanale mangime

Regioni - Nordovest	126,71	126,88
Regioni - Centro	125,11	124,55
Regioni - Sudovest	125,21	124,21
Regioni - Centro	124,48	124,72
Regioni - Nordovest	123,25	123,11
Regioni - Centro	122,79	122,79
Regioni - Sudovest	122,31	122,54
Regioni - Centro	121,41	121,18

Severanti presenti in P.e.ZS



11/11/11 a sinistra: primo caso



## Caratteristiche virus

• Dall'analisi filogenetica preliminare il virus H5N1 NPW, qui sembra correlato con virus circolati in Italia, sia domestico include il virus del precedente focolaio di Ferrara (H5N1 LPA)

• Il focolaio sembra essere stato causato dalla introduzione di un virus LPA proveniente dagli allevatori svedesi.

## Misure di controllo (DD MS 04/05/2016)

Controlli straordinari negli allevamenti di galline allevate nelle DPPA

Divieto di movimentazione di uova da pollaio della ZS (alveo derogato)

Socializzazione limitazioni tra la regione EE) e altre regioni (DPPA)

Controlli nei focolai di carne nella UE (prevalenti) il rancio (in DPPA)

Controlli filologici e serologici La spesa settimanale nelle aziende a contatto (riscaldamento misure di biosicurezza al seme dell'IDM 28 agosto 2009 su fatto igienizzanti necessarie.

## Conclusioni

- Gli obiettivi della Cooperazione si ripresentano in ordine di introduzione di una riforma per l'industria europea nazionale.
- Alcuni anni diversi dai ceppi "normalizzati" sono dotati di un alto potenziale tecnologico e possono essere responsabili di ingenti danni. È opportuno un maggior impegno del CIC e degli IZZSS per la ricerca di tecnologie e controllo di questi anni.
- Alcune aree del territorio nazionale sono particolarmente a rischio di inquinazione e di danni di vario genere. È necessario un'attenta sorveglianza di controllo in queste aree e collaborazione della tecnologia e della cooperazione (per ulteriori informazioni si rivolgeranno al 800-221818).

Grazie per l'attenzione

# **CONVEGNO**

## **Gestione territoriale delle malattie aviarie**



**PAOLO CALISTRI**

**Gestione delle malattie infettive negli avicoli:  
sistemi per la sorveglianza epidemiologica**

54° convegno della Società Italiana di Patologia Avicola  
Fiera internazionale dell'avicoltura  
Fano, 20-27 aprile

**IZSAM G. CAPOREALE  
TERAMO**

**Gestione delle malattie infettive negli  
avicoli: sistemi per la sorveglianza  
epidemiologica**  
Paolo Calisti  
Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise - G. Caporeale



**La sorveglianza epidemiologica  
delle malattie infettive**

- La sorveglianza è l'uso dell'epidemiologia per identificare, pianificare, programmare, gestire e valutare i servizi fondamentali per mantenere o migliorare lo stato sanitario delle popolazioni.



**Scopi di un sistema di sorveglianza**

- Rilevare rapidamente la presenza di una malattia (focolai)
- Rilevare e monitorare l'andamento di una malattia (endemico, epidemico...)
- Valutare lo stato sanitario della popolazione
- Dichiarare indenne un territorio da infezione o malattia
- Fornire supporto all'analisi del rischio per l'attuazione dei piani di controllo
- Valutare l'efficacia dei piani di profilassi



**Esempi di sorveglianza  
di malattie infettive negli avicoli**

- Piani nazionali salmonellosi (PNS)**
- Piano di monitoraggio della presenza di *Campylobacter* nella filiera del pollo da carne**





**Esempi di sorveglianza di malattie infettive negli avicoli  
Piani nazionali salmonellosi (PNS)**

- Predispone annualmente dalla Direttore Generale della Sanità Animale e dei Farnaci (DGSAF) del Ministero della Salute, in collaborazione con il Centro di referenza nazionale per la salmonellosi e il Centro Operativo Veterinario per l'Epidemiologia, la Programmazione, l'Informazione e l'Assalto del rischio (COVERI)
- Obbligatorio per i gruppi degli allevamenti avicoli con capacità superiore ai 250 capi delle seguenti specie e orientamenti produttivi:
  - Allevamenti Gallus gallus
  - Uccelli Gallus gallus
  - Uccelli da carne Gallus gallus
  - Tacchini da riproduzione
  - Tacchini da ingrosso



**Esempi di sorveglianza di malattie infettive negli avicoli  
Piani nazionali salmonellosi (PNS)**

- Le attività di controllo sono finalizzate al raggiungimento dell'obiettivo comunitario di riduzione della prevalenza dei sierotipi rilevanti nei gruppi di avicoli e pari:
  - All'1% o meno per i riproduttori e polli da carne Gallus gallus e per i tacchini da riproduzione e da ingrosso;
  - Almeno del 10% inferiore alla prevalenza rilevata nell'anno precedente nei gruppi di avicole Gallus gallus.
- Campionamenti ufficiali (ASL)
- Campionamenti in autocontrollo (DSA)



### Esempi di sorveglianza di malattie infettive negli avicoli

#### Piano di monitoraggio della presenza di *Campylobacter* nella filiera del pollo da carne

**Obiettivi:**

1. determinare il livello di contaminazione delle carcasse prodotte nei mattatoi italiani e la sua variabilità tra e all'interno dei letti;
2. stimare il numero atteso di fotti di macellazione non conformi ed il livello di riduzione finale del rischio in caso di applicazione di criteri microbiologici alla macellazione.



### Esempi di sorveglianza di malattie infettive negli avicoli

#### Piano di monitoraggio della presenza di *Campylobacter* nella filiera del pollo da carne

La popolazione di riferimento è composta da:

- > 5178 allevamenti da ingrasso,
- > 35 stabilimenti di macellazione.

- include la quasi totalità della produzione intensiva del pollo da carne in Italia, comprendendo tutti i maggiori produttori del settore iscritti all'Unione nazionale delle filiere agroalimentari carni e uova (UNAITALIA).
- i campioni sono prelevati in regime di autocontrollo da parte dei produttori,
- Campionamento casuale di 450 gruppi di polli carne nel corso di 1 anno.



### Sistema informativo

Qualsiasi sistema di sorveglianza necessita di un sistema informativo di supporto in grado di raccogliere e rendere disponibili in tempi rapidi tutti i dati e le informazioni necessarie per governare le attività veterinarie.




### Gestione dei dati delle malattie infettive e sistemi informativi

I sistemi informativi sono costituiti da:

- ✓ Informazioni aziendali
- ✓ Processi e procedure di gestione delle informazioni
- ✓ Risorse (uomini ed apparecchiature) per gestire le informazioni




### Qualità dei dati

I dati devono essere:

- Disponibili
- Utilizzabili
- Confrontabili
- Affidabili
- Tempestivi




### Regole che governano i sistemi informativi



1. Responsabilità:
  - le persone responsabili per la produzione e gestione dei dati e delle informazioni devono essere identificate, avere sia un livello di professionalità adeguato sia una formazione specifica;
  - i sistemi devono essere gestiti in modo da consentire la massima decentralizzazione; ciascun livello deve generare e gestire tutte le informazioni necessarie per le proprie esigenze operative.





### Gestione dei focolai di influenza Avaria

Storia del focolaio di influenza aviaria  
 20 mila polli morti nel focolo il 25/11/2014

Storico dei contatti degli allevatori, zone visitate nella ZI

Creazione del focolo nel 25/11

### Indagine epidemiologica: esempi e strategie future

Il tipo di focolaio è gestibile attraverso EpiTrace, un'applicazione integrata in SIMAP e collegata alla BMS, per il tracciamento delle movimentazioni della zona Fattoria Isacco

La comunicazione verso l'azienda focolaio

### Indagine epidemiologica: esempi e strategie future

- L'esecuzione di un'indagine epidemiologica con metodi tradizionali è un'operazione che richiede tempo e forza-lavoro. L'automatizzazione di questa operazione utilizzando uno strumento come EpiTrace permette di eseguirli molto rapidamente.
- Oltre alla rappresentazione grafica della rete, è possibile visualizzare l'elenco delle aziende incluse nella rete.
- Tutto ciò è possibile grazie alla commissione diretta alla Banca Dati Nazionale dell'anagrafe zootecnica (BDA) dove sono registrate le movimentazioni di alcune specie animali.

### Indagine epidemiologica: esempi e strategie future

La nuova indagini degli eventi in situazione del DM 13.11.2013

Per le specie avicole le movimentazioni per l'esortazione partita di uccelli devono essere registrate obbligatoriamente a partire dal 18° mese di entrata in vigore del D.M. 13/11/2013 (G.U. n.22 del 26-1-2014) in parte del debitore o delegato.

## Grazie per l'attenzione!

REALITY TV



**LEBANA BONFANTI**  
**Gestione del territorio:**  
**il caso dell'influenza aviare**

L'IPCCompagnia Italiana SPA  
FORLÌ (www.IPC.it)

Gestione del territorio: il caso dell'Influenza Aviare

(Riproduzione: CISA)



Dove eravamo?

Epidemia H5N1  
(1999-2000)



Area di intervento regionale di azione (IPCA)  
A cura dell'Ente Nazionale per lo Studio e la Cura delle Oncologie



H5N1 1999 - 2000



Costi diretti e indiretti HPAI 1999-2000

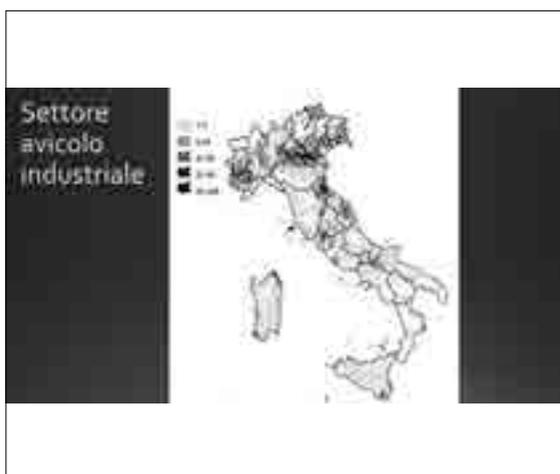


Paese	Costo Totale (Miliardi di Euro)
Italia	~100
Altri Paesi	~50

Quali strumenti per il controllo della malattia?

1 Banche dati





Guida tecnica per il controllo delle malattie  
3. Definizione delle aree a rischio

Proposta di definizione aree di rischio per la  
diffusione del virus dell'influenza aviaria

• Poligoni di Thiessen

• Definizione di un'area di competenza per ogni allevamento eccetto





## Poligoni di Thiessen

- Massimo i Poligoni di Thiessen si applicano la superficie di pertinenza di ciascun allevamento in funzione degli allevamenti circostanti
- Ha deriva che la densità degli allevamenti e viceversa, proporzionale alla superficie di pertinenza degli allevamenti: tanto più piccola è la superficie di pertinenza di un allevamento tanto più alta considerarsi elevata la densità degli allevamenti in quella zona.

## Proposta di definizione aree di rischio per la diffusione del virus dell'influenza aviaria

- Il peso per specie è adattato per ponderare il numero di capi allevabili
  - Capacità massima sostenibile del ciclo vitale
- Calcolo densità animale per area

Università degli Studi di Torino  
 Facoltà di Medicina Veterinaria  
 Dipartimento di Patologia



## Proposta di definizione aree di rischio per la diffusione del virus dell'influenza aviaria

- Definizione di un valore per poligoni considerando:
  - Capacità portante dell'allevamento
  - Area di area
  - Area di poligoni
- A questo valore applicato negli allevamenti è stato associato di peso la scala di rischio di influenza di De Groot et al., dove:
  - 1 = rischio basso
  - 2 = rischio medio
  - 3 = rischio alto
  - 4 = rischio molto alto



## Qualità del dato e del metodo

- La valutazione deve essere suscettibile di aggiornamento quando si rendono disponibili ulteriori informazioni
- La valutazione essere ben documentata e deve basarsi su informazioni in accordo con le più aggiornate e accreditate evidenze scientifiche:

## Expert opinion



Proposta di definizione aree di rischio per la diffusione del virus dell'influenza aviaria



Cuali strumenti per il controllo della malattia?

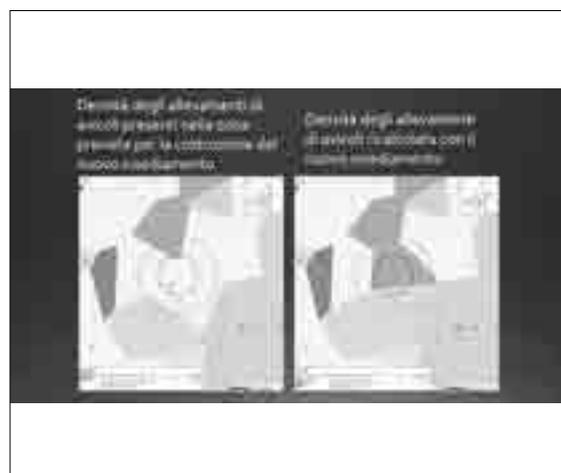
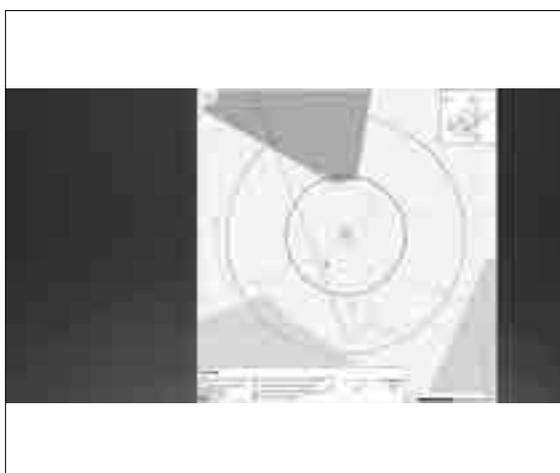
## 4. Gestione del territorio

Regione Veneto  
Legge regionale 15-2004 art. 10 lettera d

## Edificabilità

The table shows the structure of the Edificabilità (Building Suitability) assessment, organized into columns for different criteria and sub-criteria.

Obiettivo	Criterio	Sub-criterio
Obiettivo 1	Criterio 1.1	Sub-criterio 1.1.1
		Sub-criterio 1.1.2
Obiettivo 2	Criterio 2.1	Sub-criterio 2.1.1
		Sub-criterio 2.1.2
Obiettivo 3	Criterio 3.1	Sub-criterio 3.1.1
		Sub-criterio 3.1.2
Obiettivo 4	Criterio 4.1	Sub-criterio 4.1.1
		Sub-criterio 4.1.2



## Come garantire l'efficienza del sistema?

- Disporre di base dati efficienti e aggiornate;
- Conoscenza del sistema produttivo;
- Attivare sistemi individuazione rapida (early detection sistemi);
- Rafforzare le misure di biosicurezza;
- Utilizzare personale competente e con risorse adeguate.

grazie



**ANA MORENO MARTIN**

**Laringotracheite aviare:  
un esempio di gestione territoriale**

**LIV Congresso Annuale SIPA**  
 Fiera di Forlì, 16-17 Aprile 2015

## Laringotracheite aviare: un esempio di gestione territoriale

Ana Moreno Martin

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna

### PRC2011005 – Progetto di ricerca corrente

Laboratorio di Virologia – IZSLER Brescia  
 Sezione diagnostica di Forlì  
 Università di Padova

Vaccino Laringotracheitis (VLT): analisi epidemiologica e differenziazione dei ceppi attraverso il sequenziamento genomico

Durata del progetto: Dicembre 2012 – Marzo 2015

### Eziologia

- Genera *Ilavovirus* (*Herpesviridae*)
- Doppia catena DNA lineare: 155 kb
- Segmento lungo (UL) e uno corto (US), delimitato da sequenze ripetute invertite interne (IR) e terminale (TR)
- Proteine virali strutturali (più di 20) e non strutturali
- 10 glicoproteine di superficie. Responsabili della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata

### ILTV negli allevamenti broilers

- Patologia emergente in Italia
- Segnalazioni frequenti in:
  - USA (Baker et al. 2004; Nisbet et al. 2005; Cohen et al. 2009)
  - Australia (Criswell, 2004; Nisbet, 2004)
  - Canada (Ferdinand et al. 2003)
  - Olanda (De Jong, 2003; van den Broek et al. 2003)
  - Germania (Wahl, 2003; Schmittmann et al. 2003)
- Sostenute da ceppi ILTV altamente correlati con ceppi vacc CEO
- Vaccino Laringotracheitis (VLT)

### Caratterizzazione con PCR-RFLP ceppi ILTV italiani 2007-2008

Moreno et al., Av Dis, 2010

A = Field strain; VC = Vaccino CEO

### PRC2011005 – Progetto di ricerca corrente

- U.O. 1: Reparto virologia - IZSLER Brescia
- U.O. 2: Sezione Diagnostica di Forlì, Sezione Diagnostica di Lugo di Romagna - IZSLER
- U.O. 3: Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova

## Scopi

- ▣ programma di sorveglianza basato sulla diagnosi di tutti i casi clinici con sintomatologia respiratoria nei broiler e nelle galline ovaiole
- ▣ sequenziamento dell'intero genoma di un ceppo vaccinale CEO e un ceppo di campo correlato al vaccino CEO, ma con pattern di virulenza diverso
- ▣ sviluppo nuovi protocolli di PCR in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo di origine vaccinale.
- ▣ Formazione di un gruppo di lavoro costituito da personale di laboratorio, rappresentanti dell'Università, SIPA e veterinari di campo operanti in aziende di broiler, galline ovaiole e svezizzatori



## Fasi

1. Raccolta di campioni clinici
2. Sequenziamento completo del genoma virale di ceppi ILTV scelti
3. Sviluppo di nuovi protocolli end-point PCR
4. Costituzione di un gruppo di lavoro coinvolgendo tutte le categorie professionali coinvolte
5. Disseminazione dei risultati



## Fase 1 – raccolta campioni clinici

- ▣ Trachea, essudato congiuntivale, tamponi tracheali da animali con sintomatologia respiratoria riferibile a laringotracheite
- ▣ Ricerca del genoma di ILTV, IBV, aMPV, Mg, Ms



## Forme respiratorie Dic 2012-Marzo 2015

Forma	Broiler	Ovaiole	Reprod.
IBV	105 (30%+)	72 (51%+)	55 (48%+)
ILTV			
aMPV			
Mg			
Ms			
Totale	217		

Totale 217 campioni



## Clinical Score

punteggio da 1 a 4 quando più del 50% degli animali manifestano i seguenti segni clinici:

- ▣ 1 - lievemente malati: occasionalmente tosse, rantoli, starnuti. Buone condizioni generali.
- ▣ 2 - malati: Segni respiratori permanenti, rinite, congiuntivite, tracheite non emorragica, dispnea, depressione.
- ▣ 3 - gravemente malati: grave dispnea, respirazione affannosa, tracheite emorragica, emissione di muco macchiato di sangue, congiuntivite, depressione. Mortalità < 10%
- ▣ 4 - animali moribondi: segni clinici uguali al punto 3 e mortalità > 10%.



## Positivi ILTV – punteggio clinico

	0	1	2	3	4
Broiler	0	6	11	1	
Ovaiole e Reprod.	26	16			



## Forme respiratorie – Agenti eziologici

Forma	Paese	Anno	Genotipo																																																																		
Campione	Italia	2007	153.6623a																																																																		
										Campione	Italia	2011	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a																																																			
																			Campione	Italia	2012	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a																																											
																											Campione	Italia	2013	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a																																			
																																			Campione	Italia	2014	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a																												
																																										Campione	Italia	2015	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a																					
																																																	Campione	Italia	2016	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a														
																																																								Campione	Italia	2017	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a							
																																																															Campione	Italia	2018	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a
Campione	Italia	2020	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a																																																															
							Campione	Italia	2021	153.6623a	153.6623a	153.6623a	153.6623a																																																								

## Fase 2 - Sequenziamento genoma completo

- 1 ceppo di campo isolato da broilers con clinici score 4 (193435/07)
- 1 ceppo vaccinale CEO
- Selezionati per sequenziamento 2 ceppo di campo: un ceppo VLTV del 2011 e un ceppo ILTV del 1980 e 1 ceppo vaccinale CEO

## Fase 2

- 100% sequenziamento 1aA 1aB ceppi
- Ceppo campo 153.6623a
- Ceppo CEO 153.6623a
- 23 mutazioni AA/AA/AA/AA/AA
- 17 mutazioni AA
- 2 mutazioni AA ceppi di campo
- 880 (Glu) in UL32 (Mutazione primarie primarie subottici)
- 1aa (Rac) in ORFD (ED aviani)

## Fase 3 - Protocolli end-point PCR

- ORFD: inserzione 1aa(D)
- ORFE: 1 mutazione (G → A)
- UL36: 1 mutazione (H → R)
- US8: 1 mutazione (R → K)
- 89 campioni dal 2004 - 2014

## Tipizzazione ceppi

- Due profili: Vacc: no (IG-G-R-K, Campo: (H-A-H-B)
- Dv, R: 100% ceppi vaccinali
- Br: 67% ceppi campo; 33% ceppi vaccinali
- Ceppo campo: 88% (2007-2010); 14% (2011-2014)
- Ceppi vacc: 12% (2007-2010); 86% (2011-2014)
- Rurali: 100% ceppi campo (scarsa clinici)

Industria	Paese	2007				2011				2014			
		Br	Dv	R	V	Br	Dv	R	V	Br	Dv	R	V
Italia	15	10	5	0	10	5	0	0	10	5	0	0	
Francia	10	10	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	
Spagna	10	10	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	
Portogallo	10	10	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	

## Fase 4 - Costituzione di un gruppo di lavoro

- veterinari di allevamenti di broiler, svezatori
- personale di laboratorio
- rappresentanti della Società Italiana di Patologia aviaria (SIPA) e dell'Università
- Sviluppo di una strategia di cooperazione, che coinvolgerà anche l'industria, con l'obiettivo di definire le procedure e le misure di biosicurezza da applicare nella gestione dei focolai di ILTV

## Gruppo di lavoro ILTV

- Dr.ssa Ceruti
- Dr. Gavazzi
- Dr. Fasoli
- Dr. Facchetti
- Dr. Grilli
- Dr. Molena
- Dr. Morandini
- Dr.ssa Moreno
- Dr. Petercoli
- Dr.ssa Pezente
- Dr. Ragazzini
- Dr. Scaleri
- Dr. Simoni
- Dr. Trapani
- Dr. Visconti

## Strategie di controllo - gestione dei focolai

- Carico controllato
- Pollina e gestione dei morti
- Pulizie e disinfezioni
- Vuoto sanitario
- Monitoraggio
- Controllo personale di allevamento

## Carico controllato

- Macellazione dei volatili provenienti dai capannoni sani, cancellati come ultimo ritiro della giornata
- Il capannone interessato dalla malattia è stato tenuto sotto osservazione fino alla remissione della sintomatologia e avviato alla macellazione



## Pollina e gestione dei morti

- Invio dei morti ad aziende autorizzate alla fine dell'episodio e dopo macellazione degli animali una volta ristabiliti
- La pollina accatastata e coperta in area di proprietà dell'allevatore
- Trattamenti efficaci: termico 38°C x 48h compostaggio per 5 gg



## Pulizie e disinfezioni

- Lavaggio e successiva disinfezione, accurata, anche esternamente
- Derattizzazione, controllo cani e gatti



## Vuoto sanitario

- Almeno 21 g dopo l'avvenuto lavaggio e disinfezione



## Monitoraggio

- ☑ Degli allevamenti presenti nell'area attorno al focolaio
- ☑ Controllo di tutte le forme respiratorie presenti negli allevamenti (real-time PCR)
- ☑ Immediata notifica focolai



## Personale

- ☑ Evitare contatti con altri allevamenti
- ☑ Fornire tute e stivali al personale impegnato al ritiro degli animali
- ☑ Evitare di chiamare personale per la gestione di muletti o pale meccaniche, ma gestione familiare

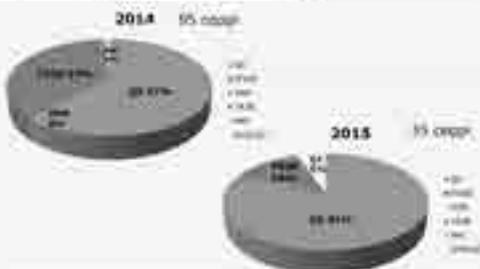
## Conclusioni e sviluppi futuri

- ☑ PCR-RFLP non differenzia ceppi di campo dai ceppi vaccinali CEO
- ☑ Sequenziamento - ceppi di campo altamente correlati con i ceppi vaccinali CEO - 17 mutazioni aa e ins di 4aa
- ☑ 2 profili che discriminano ceppi V di C
- ☑ Mutazioni dei ceppi VLT di campo potrebbero essere il risultato di retropassaggi in animali non vaccinati
- ☑ Nuovo protocollo PCR per valutare l'inserzione di 3aa in ULS2 nei ceppi di campo
- ☑ Passaggi seriali di virus vacc CEO in polli SPF e sequenziamento

## IBV: esempio di gestione territoriale

- ☑ Piani vaccinali per aree omogenee
- ☑ Valenze vaccinali scelte sulla base della presenza di genotipi IBV
- ☑ Assenza di vaccinazione in aree senza problemi respiratori

## Genotipi IBV 2014-2015



## Genotipo QX- (2014-2015)



Grazie per la vostra attenzione





**SALVATORE CATANIA,  
STEFANO MARANGON**

**Micoplasmi e territorio: disegnare il futuro**

 **Micoplasmi e territorio. Disegnare il futuro.**

Salvatore Catania e Stefano Merisgori  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Forlì, 17 aprile 2018



 **Parigi, 21 giugno 2018**  
Programma

- Il Dato dell'arte
- Obiettivo del presente contributo
- Alcuni interessanti casi degli anni precedenti
- I micoplasmi: recenti evidenze
- Il contesto territoriale
- Le prospettive future

 Salvatore Catania  
Laboratorio di Medicina Avanzata

 **Parigi, 21 giugno 2018**  
Storia dell'arte: 1700 anni?

- Microrganismi granati molto piccoli (puri di parete cellulare)
- Possono resistere numerose specie viventi



 Salvatore Catania  
Laboratorio di Medicina Avanzata

 **Parigi, 21 giugno 2018**  
Classificazione

- Dati Molecolari
- Order Mycoplasmales
  - Family Mycoplasmales
    - Genus Mycoplasma
  - Family Acholeplasmataceae
    - Genus Acholeplasma
- Incitae Sida
  - Genus Transporema
- Incitae Sida
  - Genus Spiroplasma

 Salvatore Catania  
Laboratorio di Medicina Avanzata

 **Parigi, 21 giugno 2018**  
Caratteristiche del Genere

- Difficile coltivazione (fastidious microorganismi)
- Genoma piccolo
- Senza (colisterolo), ad eszati di levito, (NAD)
- Escono dalla normale identificazione microbiologica
- Resistenza agli antibiotici ampicillina
- Digibosina
- Emaggglutinati

 Salvatore Catania  
Laboratorio di Medicina Avanzata

 **Parigi, 21 giugno 2018**  
Le specie di interesse sanitario

Specie	Parigi	1970	1980	1990	2000	2010	2018
Mycoplasma	●	●	●	●	●	●	●
Acholeplasma	●	●	●	●	●	●	●
Transporema	●	●	●	●	●	●	●
Spiroplasma	●	●	●	●	●	●	●
...	...	...	...	...	...	...	...

 Salvatore Catania  
Laboratorio di Medicina Avanzata



Parigi, 22 aprile 2019

### Le specie di importanza per il settore industriale

- 1) *Mycoplasma gallisepticum*
- 1) *Mycoplasma synoviae*
- 1) *Mycoplasma meleagridis*
- 1) *Mycoplasma caviae*
- 1) *Mycoplasma mairi*
- 1) *Mycoplasma gallinarum*
- 1) *Mycoplasma gallinocolum*



Parviziotti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare



Parigi, 22 aprile 2019

### Le specie di importanza per il settore industriale

- 1) *Mycoplasma gallisepticum*
- 1) *Mycoplasma synoviae*
- 1) *Mycoplasma meleagridis*
- 1) *Mycoplasma caviae*
- 1) *Mycoplasma mairi*
- 1) *Mycoplasma gallinarum*
- 1) *Mycoplasma gallinocolum*



Parviziotti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare



Parigi, 22 aprile 2019

### Via di trasmissione

- 1) Venoziale
- 1) Mediante vettori esportati (fornite)
- 1) Discontinua
- 1) Altra...

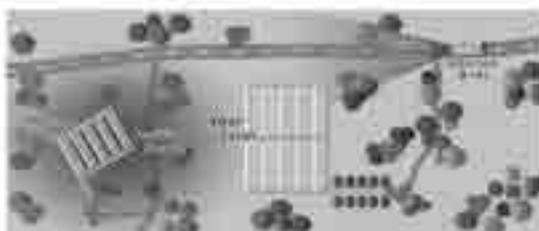


Parviziotti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare



Parigi, 22 aprile 2019

### Classificazione



Parviziotti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare



Parigi, 22 aprile 2019

### Obiettivo del presente contributo

- 1) Attenzione su specifiche e particolari caratteristiche dei micoplasmi
- 1) Contestualizzare il loro impatto in termini produttivi
- 1) Punti critici relativi al controllo della loro diffusione
- 1) Attenzione sul territorio. No approccio clinico ma epidemiologico



Parviziotti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare



Parigi, 22 aprile 2019

### Alcuni interessanti casi negli anni precedenti

- 1) Diffusione del ceppo di MG "Ospedaleto 2009/10"
- 1) MG in galline ovaiole
- 1) MH in tacorni da carne
- 1) MM in gallina faraona



Parviziotti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6 - 27 aprile 2011

Diffusione di una epizootica casale di MS



Università Cattolica  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6 - 27 aprile 2011

Diffusione di una epizootica casale di MS



Università Cattolica  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6 - 27 aprile 2011

Diffusione di una epizootica casale di MS



Università Cattolica  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6 - 27 aprile 2011

MS: aspetti economici

- 1) Prevalenza variabile (stagionata e aree particolarmente soggette)
- 2) Forme respiratorie di grado variabile (categorie produttive e colpo cervicale) (CRU) e complicanze secondarie
- 3) Scudibilità
- 4) Interventi terapeutici
- 5) Scarti alla macellazione
- 6) In generale è considerato più importante dell'MS

Università Cattolica  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6 - 27 aprile 2011

MS in galline muscove

Università Cattolica  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6 - 27 aprile 2011

MS in galline muscove

Tab. 1. Sintesi sintomatologica e sindrome clinica in MS (dati sintetizzati da vari autori)

Organismo	Località	Manifestazioni	U.S.	U.M.	U.F.	U.S.	U.M.	U.F.	U.S.	U.M.	U.F.
Italia	Emilia-Romagna	...	+	+	+	+	+	+	+	+	+
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Università Cattolica  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par. 6. 27 aprile 2019

### MS in galline nuove

- Dita alle problematiche di anomalie del guscio
- Perdita di 3 grammi peso medio uovo rispetto lo standard
- Una perdita in peso comparabile è stata confermata in una nostra infezione sperimentale con due differenti ceppi di MS.
- Inoltre durante gli anni abbiamo potuto verificare (sia in campo che in prove sperimentali) che la presenza dell'MS sembrerebbe avere un impatto negativo nel raggiungimento del picco di produzione (2%)

Parvato Corno  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par. 6. 27 aprile 2019

### MS: impatto economico produzione uova

12 mld = **MS ≥ 90%**

10 mld = **MS pos**

200 mln = **perdita annua**

15 t

Parvato Corno  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par. 6. 27 aprile 2019

### MS: impatto economico settore carne

- Prevalenza «episodi» (stagionalità e aree particolarmente soggette)
- Focolte respiratorie ad articolari di grado variabile (categorie produttive e ceppo coinvolto)
- Complicanze secondarie
- Interventi terapeutici
- Scarti alla macellazione
- In generale è considerato meno impattante dell'MG. ?????

Parvato Corno  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par. 6. 27 aprile 2019

### MS in galline da carne

**Isolation of Mycoplasma lawsonii in commercial turkey flocks**

Abstract: In 2017, we isolated Mycoplasma lawsonii from commercial turkey flocks in Italy. The isolates were characterized by genetic analysis and compared with those reported in the literature. The results showed that the isolates were highly similar to those reported in the literature. This finding suggests that M. lawsonii is a common pathogen in commercial turkey flocks in Italy.

Parvato Corno  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par. 6. 27 aprile 2019

### MS in galline da carne e loro uova

**Fast Isolation of Mycoplasma lawsonii in Grey Partridge Flocks**

Abstract: In 2017, we isolated Mycoplasma lawsonii from Grey Partridge flocks in Italy. The isolates were characterized by genetic analysis and compared with those reported in the literature. The results showed that the isolates were highly similar to those reported in the literature. This finding suggests that M. lawsonii is a common pathogen in Grey Partridge flocks in Italy.

Parvato Corno  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par. 6. 27 aprile 2019

### MS in galline da carne

- In campo la problematica si è avvertita notevole differenza di gruppo con alterazioni scheletriche
- Inoltre negli allevamenti colpiti si è avuto un netto incremento dei trattamenti terapeutici
- In una nostra infezione sperimentale (dati ancora non pubblicati) abbiamo riscontrato una diminuzione media di peso di circa 600 grammi a 30 giorni oltre che anomalie ossee negli infetti

Parvato Corno  
Laboratorio di Medicina Aviare

Parigi, 27 gennaio 2019

2019 In galina tessina

Outbreak of disease associated with *Mycoplasma meleagridis* in a free-range mixed poultry farm

Silvia Casati, Helen Cook, Vito van Heester, Roger Topley, Sara A. Hirst

Parigi, 27 gennaio 2019

Parisiere, Lorenzo  
Laboratorio di Medicina Aviare

Parigi, 27 gennaio 2019

2019 sui sottopoli industriali

- In campo la problematica non è mai stata rilevata recentemente in allevamenti di tipo industriale
- Conseguentemente l'impatto economico attuale è pari a zero

Parigi, 27 gennaio 2019

Parisiere, Lorenzo  
Laboratorio di Medicina Aviare

Parigi, 27 gennaio 2019

Cosa può essere successo?

- Miglioramento delle capacità diagnostiche?
- Cambiamenti nella tipologia di allevamento?
- Genetichè differenti?
- Di sicuri possiamo essere concordi nell'affermare che «QUALCOSA È CAMBIATO»

Parigi, 27 gennaio 2019

Parisiere, Lorenzo  
Laboratorio di Medicina Aviare

Parigi, 27 gennaio 2019

Cosa può essere successo?

Condizioni allevamento specie ospiti

Indicazioni ecologiche patogeni

Immunità ereditaria del patogeno

→ utili per il contenimento?

Parigi, 27 gennaio 2019

Parisiere, Lorenzo  
Laboratorio di Medicina Aviare

Parigi, 27 gennaio 2019

Sono delicati: chi sono?

- Microorganismi granociti molto piccoli privi di parete cellulare
- Possono infettare numerose specie viventi
- Sono tra gli organismi a più rapida evoluzione

Parigi, 27 gennaio 2019

Parisiere, Lorenzo  
Laboratorio di Medicina Aviare

Parigi, 27 gennaio 2019

ICFA of *Mycoplasma agalactiae*: a new family of self-transmissible integrative elements that confers conjugative properties to the recipient strain

Parigi, 27 gennaio 2019

Parisiere, Lorenzo  
Laboratorio di Medicina Aviare



Par.6. 21 aprile 2019  
Un concetto della citologia

- 1) Parasite Paradox
- 2) Drivers
- 3) Ecological Fitting
- 4) Oscillatory Hypothesis

Parasiti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6. 21 aprile 2019  
Dove possiamo agire?

- 1) Sulla base di ciò, è facile intuire che non siamo in condizioni di cambiare i patogeni in questione, ma dobbiamo acquisire le conoscenze e organizzare le attività veterinarie nel settore avicolo per interagire in modo proattivo con tali complessi meccanismi di adattamento, venando di individuare i "drivers" ad agire su questi.
- 2) Evitare di essere produttori di opportunità per i patogeni ricordando che i micoplasmi posseggono una marcia in più (es. allevamenti multi-specie)

Parasiti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6. 21 aprile 2019  
Dove possiamo agire?

  
 settore  
piccolo

Parasiti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6. 21 aprile 2019  
Dove possiamo agire?

  
 settore  
piccolo

Parasiti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6. 21 aprile 2019  
Dove possiamo agire?

  
 settore  
piccolo → Driver

Parasiti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare

Par.6. 21 aprile 2019  
Dove possiamo agire?

  
 settore  
piccolo → Driver

- 2) Evitare di essere produttori di opportunità per i patogeni ricordando che i micoplasmi posseggono una marcia in più (es. allevamenti multi-specie)

Parasiti, Centro  
Laboratorio di Medicina Aviare



 14/05/2019  
 11 giugno 2019

**Il territorio**

- 1) Spazio fisico definito (alterazione al punto di osservazione)
- 2) Oltre agli aspetti "fisici" si riconosce il carattere relazionale e di interscambio continuo fra tutte le diverse componenti che lo costituiscono con le conseguenti incertezze e i rischi caratteristici di un sistema complesso
- 3) Di basilare importanza è la conoscenza del territorio in quanto è il frutto delle dinamiche interattive che si svolgono continuamente all'interno di spazio fisico



 Università degli Studi  
 Laboratorio di Medicina Avanza



 14/05/2019  
 11 giugno 2019

**Territorio & Microbiota**





 Università degli Studi  
 Laboratorio di Medicina Avanza



 14/05/2019  
 11 giugno 2019

**Introduzione e monitoraggio del microbiota**

- 1) Trasmissione verticale
- 2) Trasmissione orizzontale
  - Trasporto animale vivi al macello
  - Mezzi di trasporto animali e mangime
  - Tecnici allevatori
  - Attività agricole
- 3) Mantenimento
  - Gruppi multietà
  - Assenza di vuoto sanitario
  - Gruppi a lunga vita



 Università degli Studi  
 Laboratorio di Medicina Avanza



 14/05/2019  
 11 giugno 2019

**Cosa accade al sistema**





 Università degli Studi  
 Laboratorio di Medicina Avanza



 14/05/2019  
 11 giugno 2019

**Considerazioni finali**

- 1) Non possiamo affidare sui potenziali e possibili sacrificamenti riguardanti i patogeni in oggetto
- 2) Possiamo avere un ruolo proattivo nella gestione delle popolazioni avicole allevate finalizzato al contenimento di determinate specie patogeni
- 3) Tecnologie, metodiche e conoscenze sono alla base per incidere su tali problematiche a patto che tutti gli attori coinvolti abbiano un obiettivo comune e evolvano un ciclo proattivo
- 4) Anche se ancora conosciamo poco dei microbiomi di alcuni animali ospiti che non si possono affrontare singolarmente



 Università degli Studi  
 Laboratorio di Medicina Avanza



 14/05/2019  
 11 giugno 2019

**Conclusioni**

- 1) Conoscere la reale prevalenza nel nostro territorio e su tali dati individuare gli obiettivi
- 2) Gestire tempestivamente la problematica microbiota attraverso tutti i presidi farmaceutici e conoscenze disponibili, generando traguardi realizzabili e consapevoli che sarà un lungo cammino





 Università degli Studi  
 Laboratorio di Medicina Avanza

Parlo, 27 aprile 2019

Storie su e sotto terra




 Università Campus  
 Laboratorio di Modena Azzurra

Parlo, 27 aprile 2019

adesso, occorrono giorni migliori sotto terra...




 Università Campus  
 Laboratorio di Modena Azzurra

Parlo, 27 aprile 2019

...azioni in gruppo




 Università Campus  
 Laboratorio di Modena Azzurra

Parlo, 27 aprile 2019

grazie  
per la vostra  
attenzione




 Università Campus  
 Laboratorio di Modena Azzurra

**MARCO FARIOLI**

**Il ruolo della sanità pubblica  
nella gestione delle malattie**

CONVEGNO ANNUALE SIPA  
SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA  
AVIARE  
FORLÌ, 16-17 APRILE 2015

Il ruolo della sanità pubblica nella gestione  
delle malattie

Marco Ferrari

D.C. Spada - D.O. Veneranda



Regione Lombardia

Divisione  
Epidemiologia,  
Prevenzione  
Regionale  
(D.E.P.R.)

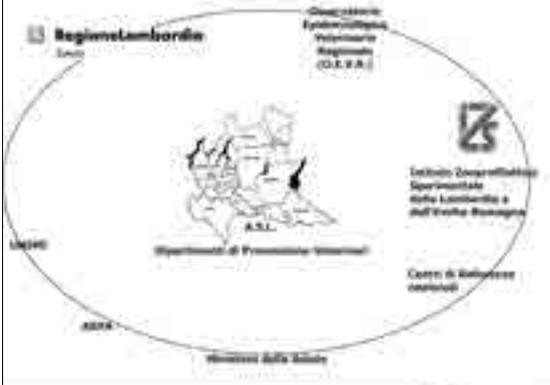
Ente Interregionale  
Sperimentale  
della Lombardia e  
dell'Emilia Romagna

Centro di Riferimento  
Nazionale

Ministero della Salute

ASL

ASL



• Regione Lombardia ha formalizzato in un Piano quadriennale (2015 - 2018) l'attività di controllo e prevenzione in campo della Sanità pubblica veterinaria; in funzione di obiettivi (vincolanti e strategici) in coerenza con la norma comunitaria, nazionale e regionale

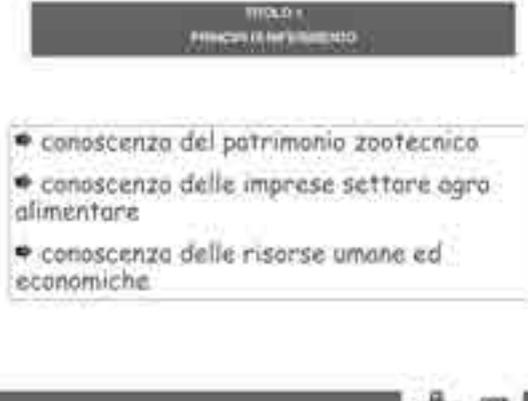
Tutela della salute pubblica, del  
patrimonio zootecnico e produzioni agro-  
alimentari



CCO veterinaria  
**Piano Regionale  
della prevenzione  
veterinaria**  
2015 - 2018

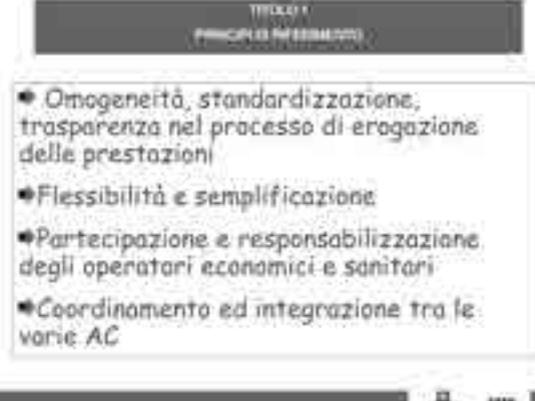
TITOLO I  
PRINCIPALI OBIETTIVI

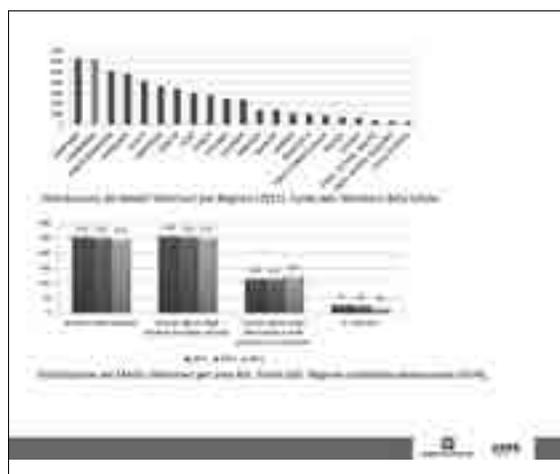
- conoscenza del patrimonio zootecnico
- conoscenza delle imprese settore agro alimentare
- conoscenza delle risorse umane ed economiche



TITOLO I  
PRINCIPALI MESSAGGI

- Omogeneità, standardizzazione, trasparenza nel processo di erogazione delle prestazioni
- Flessibilità e semplificazione
- Partecipazione e responsabilizzazione degli operatori economici e sanitari
- Coordinamento ed integrazione tra le varie AC





**Gli interventi di Sanità Pubblica Veterinaria**

↓

- prevenire l'ingresso della malattia negli allevamenti.
- individuare rapidamente eventuali focolai (circolazione virale)
- evitare la diffusione della malattia
- estinguere velocemente i focolai

OEVR

**Gli interventi di Sanità Pubblica Veterinaria**

↓

- Conoscenza del «territorio» ovvero del patrimonio zootecnico

OEVR

**ANAGRAFI ZOOTENICHE  
E  
GEOREFERENZIAZIONE  
DEGLI ALLEVAMENTI**

OEVR

**Patrimonio avicolo lombardo**  
Fonte dati: ICA-OMV (31/12/2014)

Polledri (milioni)	143
Altri ovini (milioni)	65
Capre (milioni)	12
Altri caprini (milioni)	124
Altri equini (milioni)	60
Altri equini (milioni)	6
Altri equini (milioni)	17
Altri equini (milioni) - totale	84
Altri equini (milioni)	4
Altri equini (milioni)	26
Altri equini (milioni)	5
Altri equini (milioni)	4
Altri equini (milioni)	11
Altri equini (milioni)	23
Altri equini (milioni)	70

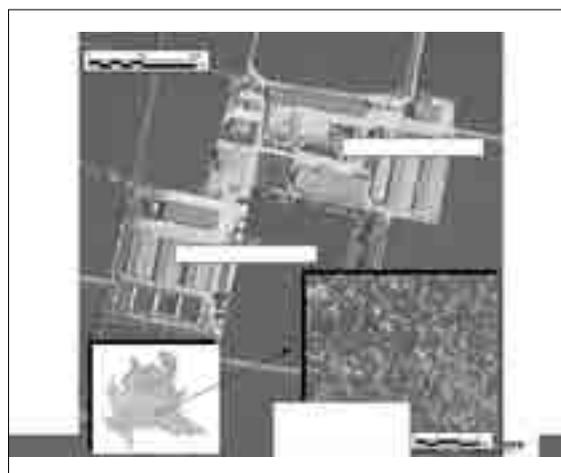
OEVR

**Elenco unità zootecniche avicole**

Prov.	Comune	Località	Attività	Superficie (ha)	Capacità (n. capi)	Stato	Contatto
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789

**Dati Avicoli**

Prov.	Comune	Località	Attività	Superficie (ha)	Capacità (n. capi)	Stato	Contatto
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789
BS	Castiglione	Castiglione	Allevamento	100	10000	Attivo	0123456789



**Gli interventi di Sanità Veterinaria in Lombardia**

↓

• **prevenire l'ingresso della malattia negli allevamenti**

Norme di biosicurezza (piano nazionale IA e salmonellosi)

**Biosicurezza: attività di verifica da parte del DPV**

Il DPV verifica il rispetto delle norme di biosicurezza negli allevamenti avicoli

- a carattere itinerario,
- negli allevatori/commercianti
- nelle fiere/mostre/mercati avicoli

Le modalità e frequenze sono in relazione al rischio di una determinata area e/o tipologia di allevamento

### 1. Biosicurezza:

Tra le misure di biosicurezza di tipo territoriale ne esistono alcune stabilite dalla legge regionale attuale nella area a rischio.



### Misure di biosicurezza a valenza regionale:

Ex area di eccezionale Ex monitoraggio intensivo

- Bilancio autorizzativo per accostamento di tacche

Ex area di eccezionale

- Dirette di accostamento di tacche e assi diretti
- Accostamento di tacche per aree omogenee

Ex monitoraggio intensivo

- Specifiche norme e accostamento di tacche e assi diretti

### Misure di biosicurezza a valenza regionale:

- nuovi allevamenti (ovvero nuovi impianti produttivi), cambio delle specie allevate e/o tipologia di allevamento;
- aumento della consistenza dei capi allevati;
- ristrutturazioni;
- cambi di proprietà;

È necessario ottenere il parere favorevole da parte del Servizio Veterinario competente per territorio, sulla base della verifica delle cartelle applicative di tutte le norme di biosicurezza e, nel caso che si tratti di proprietà, del rispetto delle distanze minime in relazione alla specie allevata e tipologia di allevamento.

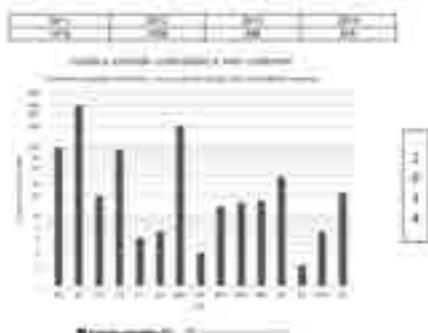
### Misure di biosicurezza a valenza regionale:

Su proposta del DDPV la Regione può adottare parere favorevole o derogare all'obbligo del rispetto di tali distanze.

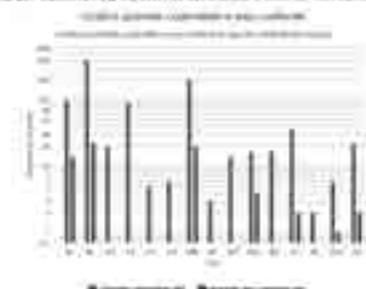
Obiettivo principale di tale campo di biosicurezza è sicuramente quello di scongiurare nuovi casi di affetti bovini, ovini e caprini, e non peggiorare le situazioni in aree già critiche.

La deroga si è rivelata un strumento utile per smorzare gli standard di biosicurezza e sensibilizzare anche i colleghi alla corretta applicazione delle norme in materia.

Monitoraggio epidemiologico, prevalenze per specie e settore di biosicurezza (2011 - 2014)



Confronto per categoria RLV tra aziende controllate e aziende non controllate nel 2012



Nel 2012 sono stati riscontrati 66 allevamenti (più precisamente rispetto al numero di allevamenti che rappresenta il 7% rispetto a quelle sottoposte a controllo). Il numero complessivo di test colturali collocate è stato pari a 327.

Stato sanitario delle aziende zootecniche e la loro distribuzione economica e geografica (dati ISTAT dal 2011 al 2014)

Settore	Numero di aziende	Uscite di prodotti (milioni di kg)	Valore in milioni di euro
2011	27	4,1	14
2012	26	4,2	14
2013	24	4,4	15
2014	26	5,1	17

L'incremento delle aziende nei confronti di quelle del censimento rilevato nel 2014 trova probabilmente un'esplicazione nel fatto che molti allevatori hanno deciso di rilevare le loro aziende zootecniche in forma di società a partecipazione plurima.

### Gli interventi di Sanità Pubblica Veterinaria



- individuare rapidamente eventuali focolai

⇒ piano di sorveglianza negli allevamenti e avifauna selvatica

### IA: Piano di sorveglianza allevamenti

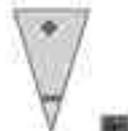
Il territorio è stato suddiviso in 3 aree in base ai seguenti fattori:

- Densità allevamenti
- N° capi allevati
- Specie allevate (tacchini, broiler...)
- Focolai pregressi
- Allevamenti integrati → filiera

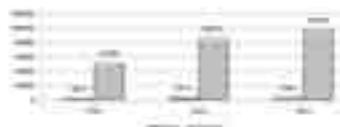
### Piano di sorveglianza negli allevamenti

Modulato in base al rischio

- RSK 1 → ex ZVE
- RSK 2 → monitoraggio intensivo
- RSK 3 → restante territorio



Allevamenti piccoli, numero di coltelli nel periodo (2011-2014), compreso monitoraggio straordinario







## WND

### Sorveglianza avifauna selvatica

- Gli uccelli selvatici sono il serbatoio e gli amplificatori dell'infezione
- Le specie bersaglio sono passeriformi, ciconiformi, caradriformi, strigiformi.
- La sorveglianza può essere:
  - attiva: corvidi catturati nell'ambito di piani di abbattimento e protezione delle colture agrarie
  - passiva: carcasse di uccelli trovati morti e conferiti ai servizi
- I campioni vengono testati con real-time PCR (vedi slide precedente per metodica)




## WND

Specie bersaglio	Struttura	Località	Stato	Numero di uccelli catturati	Numero di uccelli testati	Numero di uccelli positivi
Corvidi	...	...	...	...	...	...
Passeriformi	...	...	...	...	...	...
Ciconiformi	...	...	...	...	...	...
Caradriformi	...	...	...	...	...	...
Strigiformi	...	...	...	...	...	...







ATTI DEL LV CONVEGNO ANNUALE

## **INCONTRO**

**“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sulle principali malattie osservate  
durante il 2015”**

Padova, 5-6 Maggio 2016



## STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE

Ferdinando Battistoni

### **Bronchite infettiva:**

Malattia sostenuta da Coronavirus, nel pollo può avere sia tropismo respiratorio, sia renale.

Sintomatologia respiratoria caratterizzata da:

rantolo, scolo nasale, congiuntivite, lacrimazione, congestione ed edema polmonare ed tracheite catarrale.

Sintomatologia nefritica con reni pallidi, globosi, depositi di urati intraparenchimosi.

Nel 2014 sono stati isolati 195 ceppi da matrici quali tonsille ciecali, trachee, reni.

Nel 2015 sono stati 349 gli isolamenti, sempre dalle stesse matrici

	<b>% isolati 2014</b>	<b>% isolati 2015</b>
<b>QX</b>	59,5%	55%
<b>XQX</b>	1%	1%
<b>793B</b>	31,8%	15%
<b>M41</b>	6,1%	13%
<b>Q1</b>	1,6%	7%
<b>N.S</b>		9%

N.S . non sequenziati

### **Malattia di Gumboro:**

Annata complessivamente senza particolari problemi.

Sono stati isolati e sequenziati

16 vv DV86

11 ITA 03

2 ceppi omologia Trasmune

11 sequenziamento misto

### **LARINGO TRACHEITE INFETTIVA:**

26 Episodi nei boiler. concentrati nel basso veronese e vicentino

Animali manifestano fame d'aria, congiuntivite, tracheite emorragica. Lesion score 2-3

I vaccini di nuova generazione fatti in incubatoio possono aiutare ad abbassare la pressione virale di campo.

Fondamentale è la gestione della pollina , che deve essere trasportata su carri coperti per evitare spargimento di materiale fecale durante il trasporto.

Nelle zone più a rischio si consiglia di fare un' unica tipologia produttiva, senza sfooltimenti.

### **METAPNEUMOVIRUS AVIARE:**

71 isolamenti, sempre sierotipo B tra i 30 ed i 50 giorni di allevamento

Situazione spesso aggravata da E.Coli, ed associato ad Bronchite infettive.

### **ENTERITE VIRALE:**

Agente eziologici sono Astrovirus, Rotavirus, Enterovirus –like.

Si manifesta in pulcini di 7 giorni, gli animali presentano scarsa crescita, disuniformità del gruppo con inevitabile peggioramento delle performance produttive.

Feci imbibite d'acqua e scadimento della lettiera

All'esame anatomopatologico si evidenzia un assottigliamento della parete intestinale con contenuto fluido con bolle di gas.

È importantissimo fare una buon lavaggio e disinfezione ed allungare il vuoto sanitario.

### **RIEMERELLA ANATIPESTIFER:**

In aumento rispetto al 2014.

Sono stati segnalati 22 episodi, con 19 isolamenti dall'encefalo e 3 da articolazioni. Sintomatologia tipicamente neurologica, con tremori del capo, movimenti ritmici della testa, opistotono, decubito tarsale.

All'esame anatomico-patologico si evidenzia epatomegalia, pericardite fibrinosa, arto sinovite purulenta dell'articolazione tibio-tarso metatarsica.

Risponde bene alla terapia con amoxicillina e sulfamidici.

Con la vaccinazione dei tacchini per Riemerella i casi di infezione dei broilers sono però in diminuzione.

### **GALLIBACTERIUM ANATUM:**

Famiglia delle Pasteurellaceae

Segnalati interessanti e rari casi in 7 allevamenti di broilers (2 polmonari, 3 da cervello, 1 da fegato, 1 da sacchi aerei)

Età compresa tra i 23 e 48 giorni

Forma respiratoria, scolo nasale, anoressia, disidratazione, quadri di setticemia con infezioni miste di E.Coli

### **SPONDILITE DA ENTEROCOCCO CECORUM:**

Gram +, Segnalate osteomieliti a carico delle ossa lunghe e corpi vertebrali

Osservata in polli di 4-5 settimane con isolamento dell'enterococcus cecorum da osteomieliti delle vertebre toraciche Sintomatologia cosiddetta "kinky-back" associata a spondilite da e.cecorum e' in aumento

Difficoltà di deambulazione, decubito prolungato sui tarsi e sul coccige, difformità di accrescimento del gruppo

Alcuni si aiutano con le ali per la deambulazione

Difficili le terapie data la particolare localizzazione del microrganismo con difficoltà del farmaco a raggiungerlo, soprattutto con terapie per via orale

Sensibilità verso i beta-lattamici

### **ISTOMONIASI:**

Agente eziologico. Histomonas Meleagridis

Heterakis come vettore

Histomonas penetra nella parete del cieco dove si moltiplica, circolo ematico e fegato.

Sintomatologia clinica dopo circa 10 gg, Morbilità e mortalità nel pollo è bassa

Sintomatologia: Diarrea giallo zolfo

Animali abbattuti, ali abbassate, anoressia, a volte testa cianotica.

Lesioni anatomo -patologiche. Stampi necrotico-fibrinosi ciecali e lesioni necrotiche circolare definite a “bersaglio”

Diagnosi: anatomo -patologica. PCR

Ringraziamenti.

- F. Muccioli
- P. Fasoli
- L. Giusti
- E. Morandini
- A. Dell'Angelo
- R. Ceruti
- A. Moreno

## STATO SANITARIO DELLE GALLINE OVAIOLE 2015-2016

Antonio Camarda, Elena Circella

*Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sezione di Patologia Aviaria, S.p. per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano (Bari)*

La presente relazione brevemente raccoglie i dati e le segnalazioni provenienti dai colleghi che operano sul campo o nei laboratori di riferimento di settore.

Come negli anni precedenti, si porrà l'accento sulle patologie infettive, infestive e parassitarie nonché alle forme morbose ad eziologia diversa che più hanno rappresentato nell'ultimo anno motivo di preoccupazione e di interesse per il comparto.

Lungi dal voler essere avere valenza scientifica o statistica questa relazione è una fotografia di quello che in campo più frequentemente è stato osservato dell'anno appena trascorso.

### **Patologie ad eziologia virale**

La bronchite infettiva rappresenta certamente una delle forme morbose osservate più di frequente. La malattia è endemica in molte parti della penisola e vari sono i ceppi e le varianti riscontrati in campo. Più rappresentati sono QX, XD3, 793B M41, Q1.

In Sicilia l'M41 e il 793B sono più frequentemente isolati, ma sembra essere presente anche il QX. Quest'ultimo è stato segnalato anche in Puglia ed in vaste aree del Nord Italia ad elevata vocazione avicola. La commercializzazione di un vaccino omologo ha di fatto aiutato moltissimo a contenere la sintomatologia clinica nei gruppi infetti.

Nel complesso la malattia si presenta con forme respiratorie, oviduttiti con decadimento qualitativo delle uova e casi caratterizzati dal fenomeno delle false ovaiole. Si segnala in Puglia un caso sostenuto da virus QX caratterizzato da lesioni renali e gotta articolare.

Tra le altre patologie ad eziologia virale, la Malattia di Marek è segnalata sporadicamente in Umbria sia in allevamenti a terra che in gabbia prevalentemente di piccole dimensioni.

Una segnalazione particolarmente interessante proviene dal dott. Alessandro Scolari il quale ha riportato un focolaio di EDS 76 in un allevamento del Nord Italia. La malattia in Italia non si osservava da numerosi anni ed era considerata pressochè scomparsa.

Il focolaio, a lenta evoluzione, si è manifestato con un tipico calo della produzione che è giunto fino al 50%, associato alla deposizione di uova senza guscio. Gli animali del gruppo colpito manifestavano titoli inibenti l'emoagglutinazione (IHA) anche superiori a 1:4096. La malattia non si è diffusa al capannone attiguo a quello colpito in cui i titoli anticorpali (IHA) si sono mantenuti sotto 1:8.

Per quanto attiene l'influenza Aviaria, si rimanda alla relazione del dott. Terregino. Si evidenzia solo che in Provincia di Ferrara nella prima settimana di maggio è stato denunciato un focolaio di malattia sostenuto dal sottotipo H7N7.

Assente nel 2015-16 la Pseudopeste aviaria.

### **Patologie ad Eziologia Batterica**

Le colibacillosi rappresentano certamente le forme morbose ad eziologia batterica più segnalate e più diffuse in tutta Italia. Sembra che la malattia tenda ad essere più presente negli allevamenti in batteria piuttosto che in quelli a terra.

La colibacillosi è diffusa sia in forma primaria che secondaria; in questi casi complica infezioni sostenute da *Mycoplasma* spp, dal virus della Bronchite infettiva o errori tecnico manageriali quali prolassi e cannibalismo.

Il ricorso sempre più frequente alla vaccinazione sembra contribuisca a ridurre la gravità e l'incidenza.

I colleghi di Perugia la segnalano associata ad una rara forma di granulomatosi in piccoli allevamenti dell'Umbria.

Tra le forme respiratorie batteriche, l'Istituto Zooprofilattico di Padova segnala la circolazione di *Mycoplasma (M) gallisepticum* non associato a patologie clinicamente evidenti. Il *M. synoviae* è anch'esso in netto calo rispetto allo scorso anno mentre sono in aumento nei gruppi multietà infezioni asintomatiche sostenute da *M. gallinaceum* e *M. gallinarum*, In ogni caso, si riporta la presenza di gruppi positivi in assenza di manifestazioni cliniche evidenti in fase di monitoraggio.

Dal punto di vista clinico, la malattia si manifesta con una tipica alterazione della qualità del guscio (apex) caratterizzata da una riduzione dello spessore del guscio ai poli associata a un variazione della pigmentazione del guscio che in posizione apicale appare rugoso, di colore più scuro e fragile.

In Campania la Micoplasmosi da *M. synoviae* è stata riscontrata anche nella forma classica di artrosinovite ed associata all'alterazione della qualità delle uova sopra descritta che poteva interessare anche all'8% della produzione del gruppo.

Anche in questo caso, come per le colibacillosi, è possibile ritenere che nonostante la circolazione del germe responsabile della malattia, il ricorso alla vaccinazione ne possa aver ridotto l'incidenza clinica, e contenuto i danni.

La tifoosi aviare è stata osservata sporadicamente, a volte in allevamenti in cui era stata riportata in cicli precedenti, altre volte in piccole aziende rurali. Tutti concordano sul fatto che la malattia è in netto calo sul territorio nazionale.

Per quanto riguarda le infezioni da salmonelle mobili, si rimanda ai dati diffusi dal Centro di Referenza Nazionale sulle Salmonellosi. Si evidenzia una strettissima e capillare campagna di vaccinazione nei confronti delle salmonelle rilevanti per il piano nazionale di monitoraggio (*S. enteritidis* e *S. typhimurium*). Si segnalano reperti occasionali di infezioni da *S. enteritidis* in gruppi di ovaiole, evidenziati soprattutto in corso di campionamenti ufficiali; un caso viene riportato in un allevamento multietà in Calabria, uno in Puglia. In quest'ultimo caso il gruppo contaminato era particolarmente giovane (8 settimane di deposizione), ed al picco della deposizione. In tutti i casi, i gruppi positivi sono stati sottoposti alle misure di controllo previste dalla normativa vigente.

Relativamente alle infezioni sostenute da *S. typhimurium* si evidenzia la circolazione, sia pure sporadica, della variante monofasica del germe.

Si segnala, infine, il riscontro di una Salmonella del Gruppo D di Kauffmann-White non rilevante su un gruppo di soggetti a fine ciclo che sono stati comunque eliminati.

Tra le forme batteriche di riscontro occasionale si segnalano alcuni casi sporadici di epatite vibrionica in Campania in cui era scarso il controllo degli insetti volanti, e di Clostridiosi sia in pollastre che in ovaiole.

Una patologia evidenziata nell'ultimo anno e che è stata anche motivo di apprensione per gli operatori del settore è l'artropatia amiloide.

La malattia è riportata in molte regioni italiane ed è stata osservata in particolare lo scorso anno in primavera-estate. In autunno-inverno l'incidenza si è ridotta. La forma morbosa tende ad interessare in particolare le pollastre. Conseguenza è una tipica forma di nanismo ed un aumento del numero degli scarti in fase di produzione. È probabile che il divieto di intervenire sugli animali in incubatoio con una metafilassi specifica abbia favorito la comparsa della malattia. Il miglioramento delle condizioni igieniche durante la raccolta delle uova da incubare sembra aver dato buoni risultati e ridotto dell'incidenza della patologia. Anche il ricorso ad un vaccino stabulogeno in gruppi parentali sembra aver dato buoni risultati determinando un significativo contenimento della forma morbosa.

### **Patologie ad eziologia parassitaria**

Le infestazioni da *Dermanyssus gallinae* rappresentano probabilmente il più importante problema sanitario per l'allevamento della gallina ovaioia.

Questo acaro è omogeneamente segnalato su tutto il territorio nazionale. In Campania si segnalano persino casi di mortalità indotte da infestazioni massive, associate ad anemia. In questi gruppi, lo scarto delle uova è notevole ed è legato sia ad una riduzione generale della qualità del guscio, sia alla presenza degli acari che vengono schiacciati in fase di raccolta e che, ingorgati, macchiano la superficie dello stesso.

L'importanza del problema delle infestazioni da *Dermanyssus* è ormai sentito anche a livello Comunitario, tanto che è attualmente in corso un progetto COST denominato COREMI – “*Improving current understanding and research for sustainable control of the poultry red mite Dermanyssus gallinae*”, il quale ha come obiettivo quello di incentivare, a livello europeo lo studio e lo scambio di conoscenze sull'acaro rosso ai fini di giungere a mettere a punto una efficace strategia di controllo in azienda.

Il progetto, tra l'altro, mette in rilievo l'importanza dell'acaro rosso anche quale responsabile di patologia anche per l'uomo, all'interno ed all'esterno degli allevamenti.

Tra le malattie parassitarie, si segnalano infine, negli allevamenti a terra, casi di infestazioni da nematodi e coccidi.

### **Micotossicosi**

I dati sull'incidenza delle micotossicosi sono contrastanti. Se da un lato alcuni ne segnalano una riduzione, altri ne evidenziano un aumento significativo.

Queste forme tossiche sono riconducibili in particolare alla presenza di Desossinivalenolo (DON), fumonisina o aflatossine nel mangime e si manifestano, genericamente, con un calo dell'appetito, della deposizione e della qualità delle uova deposte. In Emilia Romagna sono segnalati casi ricorrenti di intossicazione con cali di deposizione importanti e repentini che giungono anche fino al 15-20%.

In Nord Italia alcuni segnalano livelli di contaminazione di Aflatossine nel mangime prossimi a 20 ppm, mentre le quantità medie di DON e Fumonisina si manterrebbero rispettivamente su valori contenuti di sotto 1 e 5 ppm.

In alcuni allevamenti sono stati osservati gravi problemi sanitari causati da micotossine e caratterizzati da gastriti emorragiche, ulcere e melena, con cali di deposizione e del consumo di mangime, risolti utilizzando mangimi che contenevano cereali provenienti dall'estero.

## **Tecnopatie**

L'applicazione del DL 267/2003 ha determinato un cambiamento nelle modalità di allevamento nel nostro paese che, inevitabilmente si è ripercorso sullo stato sanitario delle ovaiole. Ne sono un esempio i casi di parassitosi precedentemente citati.

Gli operatori che operano nel settore, segnalano spesso difficoltà nella gestione igienico sanitaria dei gruppi, a causa della complessità strutturale delle attrezzature e delle modalità di management adottate. Le ripercussioni sulla salute degli animali o sulla qualità delle produzioni è inevitabile.

Si segnala, ad esempio, uno scarto maggiore di uova legato all'imbrattamento del guscio, ad un eccesso nel consumo del mangime o anche difficoltà nell'assicurare la pulizia dei tappetini in plastica che delimitano il nido i quali si sporcano di feci più facilmente e rappresentano un ottimo rifugio per il *Dermanyssus gallinae*. I costi di gestione, in queste condizioni sono inevitabilmente destinati ad aumentare.

Si segnala, infine, in Campania un caso di predazione da selvatici. L'episodio ha interessato un allevamento di ovaiole in batteria in cui si è osservata una improvvisa notturna mortalità a carico degli animali delle gabbie poste al piano inferiore.

L'esame autoptico rivelava in tutti i soggetti deceduti lesioni emorragiche al collo e lesioni da morso.

## **CONCLUSIONI**

L'esame dei casi segnalati nel corso dello scorso anno evidenzia per il comparto delle galline ovaiole una situazione sanitaria nel complesso stabile, che, ad eccezione per l'episodio di EDS 76 segnalato, non ha visto la circolazione di nuovi patogeni e/o la diffusione di patologie di difficile controllo. Il settore, almeno dal punto di vista sanitario, non desta particolari preoccupazioni e le problematiche segnalate dai vari colleghi e laboratori che operano nel settore sono, in linea di massima, correttamente gestite.

Il monitoraggio stretto dei gruppi in produzione resta la strategia più efficace al fine di ottenere un rapido riconoscimento delle problematiche emergenti e la messa a punto di piani di intervento utili ad impedirne la diffusione negli allevamenti.

## **Ringraziamenti**

Questa relazione è stata possibile grazie alla collaborazione dei seguenti colleghi che hanno fornito i dati:

- |                              |                                      |
|------------------------------|--------------------------------------|
| ▪ Salvo Catania              | IZS delle Venezie, Sezione di Padova |
| ▪ Mauro Castello             | Libero professionista                |
| ▪ Ludovico Dipineto          | Università degli Studi di Napoli     |
| ▪ Maria Pia Franciosini      | Università di Perugia                |
| ▪ Davide Giovanardi          | Veronesi, Verona                     |
| ▪ Antonino Messina           | Libero Professionista                |
| ▪ Paola Massi                | IZSLER Sezione di Forlì              |
| ▪ Fabrizio Russo             | Libero Professionista, Campania      |
| ▪ Alessandro Scolari         | Laboratorio La Vallerana, Cremona    |
| ▪ Calogero "Lillo" Terregino | IZS Delle Venezie, Padova            |
| ▪ Giovanni Tosi              | IZSLER Sezione di Forlì              |
| ▪ Sezione di Perugia         | IZS delle Marche e dell'Umbria       |

## LE PRINCIPALI PROBLEMATICHE SANITARIE DELLE SPECIE “MINORI” NEGLI ANNI 2015-16

Alessandro Scolari

*Laboratorio di Analisi Veterinarie – Vallerana Srl  
v/ del Maris 6/A – 26100 Cremona*

### Riassunto

Le cosiddette “specie minori” (faraone, anatidi, specie *Gallus gallus* allevata per produzioni di nicchia, selvaggina allevata per ripopolamento), in Italia arricchiscono e rendono vario il panorama dell’avicoltura, non solo per la diversità degli allevamenti e delle tipologie produttive, ma anche per le patologie che occasionalmente possono essere osservate tra i soggetti allevati.

Sono qui riassunte le principali malattie riscontrate in questi settori nell’ultimo anno.

Nelle **faraone** (*Numida meleagris*), nei primi giorni di vita sono stati riportati soprattutto casi di onfalite e di setticemia, con isolamento di *E.coli*, *Pseudomonas spp* e stafilococchi. A questa età, si sono manifestate frequentemente enteriti ad eziologia virale, sostenute soprattutto da *Rotavirus* ed *Astrovirus*. Spesso i danni causati da questi agenti erano aggravati da altre patologie dell’apparato gastrointestinale, quali candidiasi, tricomoniasi e coccidiosi.

In soggetti più adulti sono comparse con una certa frequenza setticemie causate da *E.coli*, *Riemerella anatipestifer* e *Staphylococcus aureus*. La presenza di *Clostridium perfringens* è stata notata nell’intestino, non sempre associata alla comparsa di enterite necrotica.

La colisetticemia rimane la patologia batterica più diffusa tra gli **anatidi**, nei quali e’ stata anche segnalata in forte aumento la presenza di *Pasteurella multocida* (sierotipi 1 e 4), come agente eziologico di malattie polmonari e forme setticemiche. Il germe è stato inoltre non di rado isolato in casi di artrosinoviti purulente, nelle articolazioni tibio-tarsiche e plantari.

Tra le malattie virali è importante segnalare la comparsa di un episodio di parvovirosi in anatre da carne di 40 gg., vaccinate solo ad 1 giorno di età con il vaccino bivalente (contenente i ceppi della Malattia di Derzy e della parvovirosi dell’anatra). La corretta copertura vaccinale per questa tipologia di animali si ottiene con l’effettuazione di una seconda vaccinazione a circa 14-18 gg. utilizzando lo stesso vaccino bivalente. Nei prossimi mesi si prevede un aumento del rischio di comparsa di questa patologia, per la carenza di presidi immunizzanti specifici. Per questo motivo, il Ministero della Salute sta concedendo deroghe alle Regioni che ne fanno o faranno richiesta, per poter utilizzare vaccini registrati in Europa, ma non in Italia, nei confronti delle parvovirosi degli anatidi.

Nei **capponi** e nei **galletti leggeri**, la micoplasmosi da *Mycoplasma synoviae* ha causato i problemi più gravi, con insorgenza di bursiti sternali e difficoltà di pigmentazione.

Nel settore dei **polli rurali** la bronchite infettiva ha prodotto gravi sintomi respiratori in allevamenti da svezzamento, principalmente in Veneto e Lombardia. Nella maggior parte dei gruppi colpiti è stata riscontrata, con il test PCR, la

presenza dei ceppi QX e Q1,. L'utilizzo di vaccini contenenti il ceppo QX ha prevenuto l'insorgenza dei sintomi respiratori o ne ha contenuto la gravità .

Le sindromi gastroenteriche si sono manifestate con frequenza nelle prime settimane di vita in questa tipologia di allevamento , ad eziologia prevalentemente virale , nelle quali, con la tecnica dell'immunolettromicroscopia, è stata riscontrata spesso la presenza di Astrovirus e Rotavirus. I danni causati dai virus sono stati spesso aggravati da complicità batteriche.

Il settore della **selvaggina** (fagiani, quaglie, starne e pernici rosse allevati a scopo di ripopolamento), ha tratto benefici dal favorevole andamento climatico del passato inverno. Il clima mite ha prolungato la stagione venatoria ed ha contribuito alla riduzione dei problemi all'apparato respiratorio che con frequenza affliggono le aziende avifaunistiche. Sono comunque stati riportati episodi di micoplasmosi da *Mycoplasma gallisepticum*, soprattutto in fagiani, che si manifestavano con riniti, blefarocongiuntiviti e sinusiti. Sono state viste inoltre in tutte le specie sindromi gastroenteriche, frequenti nel primo mese di vita , con presenza di diversi agenti patogeni virali, batterici e parassitari, che spesso agivano in associazione (Astrovirus, Rotavirus, E.coli, Enterococchi, Coccidi, Tetratrichomonas). Alla necropsia si rilevava: grave enterite con assottigliamento della parete intestinale, tifliti schiumosa , presenza di feci liquide e collose. I gruppi colpiti manifestavano grave disuniformità, anoressia, dimagrimento , grave depressione del sensorio ed aumento della mortalità.

Questa rassegna sulle principali problematiche sanitarie riscontrate nelle specie "minori" è stata completata con il supporto e la collaborazione di diversi colleghi, di seguito elencati, operanti sia in campo che in laboratori diagnostici:

Dr. Giovanni Burzoni

Dr. Frasnelli Matteo

Dr. Davide Giovanardi

Dr. Emilio Morandini

Dr. Andrea Ragazzini

Dr. Luigi Toffoli

Dr. Giovanni Tosi



ATTI DEL LV CONVEGNO ANNUALE

**CONVEGNO**

**“Infezioni emergenti e riemergenti  
nella moderna avicoltura”**

Padova, 5-6 Maggio 2016



## **LA CARATTERIZZAZIONE BATTERICA NELLO STUDIO DI ALCUNE MALATTIE EMERGENTI E RIEMERGENTI DEL POLLAME**

Luca Bano & Giovanni Tosi

*Sezione Diagnostica di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4 int. 5-6, 31020 Fontane di Villorba, Treviso*

*Sezione Diagnostica di Forlì, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via don Eugenio Servadei, 3/E-3/F, 47122, Forlì*

Le ragioni alla base della “comparsa” o “ricomparsa” di una malattia possono essere molteplici e non riguardano necessariamente mutazioni del patogeno. Basti pensare alle recenti profonde modifiche apportate al sistema d'allevamento della gallina ovaiola che hanno favorito il riemergere di alcune patologie (es. elmintiasi intestinali, istomoniasi ecc.) che si ritenevano scomparse quando gli animali erano allevati in batteria. E' possibile che anche i recenti focolai di influenza aviaria, osservati in allevamenti biologici di ovaiole, siano stati favoriti da una tipologia d'allevamento che, per sua natura, comporta standard di biosicurezza non elevatissimi.

Altri fattori che possono favorire la comparsa di nuove e vecchie patologie sono da ricercare nel cambiamento dell'impiego degli antimicrobici, dei protocolli vaccinali, della qualità delle materie prime alimentari e nella disponibilità di genetiche sempre più performanti, ma talvolta più sensibili alle malattie in condizioni d'allevamento non ottimali.

Alla complessità dei fattori predisponenti sopraelencati, che stanno alla base delle patologie batteriche emergenti e riemergenti, vanno aggiunte anche le caratteristiche di pertinenza dell'agente eziologico. Esistono infatti delle sub-popolazioni batteriche appartenenti ad una stessa specie, che possono essere distinte in base alla virulenza, alla diffusibilità, alla resistenza agli antimicrobici, alla capacità di evocare una risposta immunitaria specifica nell'ospite, ecc., presentando, in sostanza, caratteri fenotipici o genotipici diversi. I caratteri fenotipici sono quelli “manifestati” dal microrganismo come ad esempio la morfologia, lo sviluppo, le proprietà biochimiche e il comportamento in determinate condizioni ambientali. I caratteri genotipici sono considerati “identitari” della cellula batterica in quanto presenti nel DNA e per tale ragione vengono utilizzati quando si vogliono indagare le omologie all'interno di una popolazione batterica, utili ai fini epidemiologici, oppure per evidenziare fattori genetici di virulenza.

Per caratterizzare genotipicamente i microrganismi abbiamo la possibilità di ricorrere a vari sistemi: da quelli che ci consentono di ricercare singoli geni a quelli che ci permettono di caratterizzare l'intero genoma della cellula batterica. A seconda del quesito diagnostico/epidemiologico a cui si vuole rispondere, verrà scelto il metodo di caratterizzazione più adatto allo scopo.

Ad esempio, se siamo interessati alle proprietà antigeniche del microrganismo per tentare un possibile approccio vaccinale alla malattia, ci interesserà conoscere il sierotipo dell'isolato (carattere fenotipico). Si prediligerà invece una caratterizzazione su base genetica se si vogliono indagare particolari fattori di virulenza oppure analogie tra microrganismi isolati da diverse nicchie biologiche per studiare le possibili fonti

d'infezione o la diffusibilità di un particolare clone all'interno di uno stesso focolaio o in episodi diversi di malattia. Queste ultime informazioni sono utili, ad esempio, per mettere in atto possibili azioni di profilassi indiretta.

Un esempio di applicazione di caratterizzazione batterica è quella che ha riguardato alcuni ceppi di *C. perfringens* isolati da casi gravi di enterite necrotica (NE), osservata con insolita frequenza negli ultimi anni in ovaiole commerciali. Grazie a questo studio si è potuto appurare che i ceppi responsabili di questa patologia erano dotati di un importante fattore genetico di virulenza che codifica una tossina "pore-forming" denominata NetB, strettamente associata alla forma clinica di NE. Sorprende la frequenza d'isolamento di ceppi di *C. perfringens* NetB-positivi in ovaiole con evidenti lesioni necrotiche intestinali, rispetto a quanto osservato in precedenza nel broiler. E' noto che l'NE è una malattia in cui fattori predisponenti (alimento, coccidiosi, immunità ecc.) giocano un ruolo essenziale, ma la proliferazione intestinale di questi ceppi altamente patogeni può portare alla comparsa di quadri anatomopatologici a volte drammatici, soprattutto in una categoria produttiva come l'ovaiola in cui il ruolo dei coccidi è pressoché nullo.

Tra le malattie riemergenti, negli ultimi anni è stata osservata una recrudescenza della riemerellosi in allevamenti di tacchini e la comparsa di episodi sporadici di malattia anche in allevamenti di polli da carne. Sebbene non vi sia una convergenza sulla denominazione del biotipo da assegnare ai ceppi isolati, la loro caratterizzazione tramite tecnica MALDI TOF (caratterizzazione fenotipica basata su proteine "fingerprint") ha dimostrato come, per una stessa filiera, vi sia la circolazione di uno stesso "spettrotipo", sia negli allevamenti di broiler che di tacchini. Quest'informazione suggerisce che le ragioni del passaggio dal tacchino al pollo, e viceversa, vanno ricercate nelle occasioni di "contatto" tra le due tipologie d'allevamento (es. promiscuità di squadre di carico e vaccinazione o di personale tecnico o sanitario; veicoli per il trasporto del mangime o degli animali ecc.).

Di particolare interesse è l'aumento delle patologie sostenute da enterococchi quali la spondilite da *Enterococcus cecorum* che colpisce polli da carne e riproduttori, e l'artropatia amiloide delle pollastre causata da *Enterococcus faecalis*. Nella prima, studi di caratterizzazione genetica hanno permesso di dimostrare che tutti i ceppi di *E. cecorum* isolati da lesioni spinali di soggetti diversi di uno stesso gruppo, sono uguali fra loro. Vi è quindi "clonalità" del ceppo isolato in uno stesso gruppo, a fronte di una eterogeneità delle popolazioni di *Enterococcus cecorum* presenti nell'intestino di un soggetto sano. E' evidente che esistono quindi delle differenze di patogenicità che consentono ad alcuni ceppi di giungere per via ematogena in una zona sottoposta a importanti sollecitazioni meccaniche (vertebra toracica mobile) e di dare lesioni in questa sede. Tali ceppi potrebbero anche essere selezionati a livello intestinale attraverso trattamenti farmacologici somministrati per via orale. Anche nello studio dell'artropatia amiloide della pollastra si sta tentando un approccio di caratterizzazione dei ceppi di *E. faecalis* per comprendere se esistono delle relazioni genetiche tra ceppi isolati da lesioni, incubatoio e riproduttori e cercare di chiarire quali possano essere i punti critici. Oltre che per motivi sanitari, le informazioni potranno essere utilizzate anche per dirimere alcuni aspetti più propriamente commerciali.

Tra le più interessanti patologie emergenti e riemergenti del pollame osservate recentemente in diversi laboratori diagnostici si segnalano: le affezioni respiratorie da

*Ornithobacterium rhinotracheale* nel pollo da carne, le setticemie da *Erysipelothrix rhusiopathiae* nelle ovaiole e la dermatite gangrenosa osservata in broiler e riproduttori pesanti.

La comparsa di nuove e vecchie patologie ad eziologia batterica sarà sempre una sfida per il settore avicolo e le regole per l'impiego degli antimicrobici saranno sempre più restrittive. La caratterizzazione batterica è uno strumento utile per cercare di comprendere la patogenesi e l'epidemiologia di queste malattie e cercare di mettere in campo delle azioni di profilassi diretta e indiretta efficaci.

## **IS *MYCOPLASMA SYNOVIAE* OUTFRIPPING *M. GALLISEPTICUM*?**

Wil J.M. Landman & Anneke Feberwee

*GD – Animal Health Service, Arnsbergstraat 7, 7418 EZ Deventer, the Netherlands*

E-mail: w.landman@gddeventer.com

*Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* are the most relevant mycoplasma species for commercial poultry from the clinical and economic point of view. Although the importance of *M. gallisepticum* was recognized many decades ago, the relevance of *M. synoviae* has always been a matter of debate. Until the turn of the century, only the respiratory and synovitis form of the disease occurred, while the majority of infections were subclinical. After the year 2000 *M. synoviae* strains with oviduct tropism able to induce eggshell apex abnormalities and egg drops have emerged worldwide. A decreasing incidence of *M. gallisepticum* has been observed at least in reproduction stock in countries with control and eradication programs for this mycoplasma species. In contrast, the seroprevalence of *M. synoviae* is much higher especially in layer flocks, in most continents exceeding 70%. Given the emergence of virulent *M. synoviae* strains with oviduct tropism, its ability to also induce joint and respiratory disease, to act synergistically with other pathogens as well as its much higher seroprevalence, it seems that *M. synoviae* is outrunning *M. gallisepticum* at least in countries with control and eradication programs for the latter. It stresses the need to update *M. synoviae* prevention and control strategies. In agreement herewith, the Dutch poultry industry implemented a mandatory control and eradication program for *M. synoviae* at all levels of poultry farming excepting broilers, which was launched in January 2013.

## STRATEGIES TO CONTROL HISTOMONOSIS IN POULTRY

Dieter Liebhart, Dipl. ECPVS

*Clinic for Poultry and Fish Medicine, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria*

[dieter.liebhart@vetmeduni.ac.at](mailto:dieter.liebhart@vetmeduni.ac.at)

Histomonosis (syn.: blackhead disease or histomoniasis) was firstly described by Cushman, 1893 in turkeys. Nitrofurans and nitroimidazoles, the only available drugs against histomonosis in Europe, were withdrawn by the authorities due to concerns on product safety. Similar to this, the ban on chemotherapeutics for the use against histomonosis was also executed in other countries. As a consequence, reports about outbreaks of the disease in poultry flocks increased due to the re-emergence of histomonosis.

*H. meleagridis* is unicellular, from 3 to 21  $\mu\text{m}$  in size and is composed of organelles typical for trichomonads. Commonly, two stages of *H. meleagridis* can be differentiated, i) the flagellated caecal lumen form and ii) the tissue form without flagella. The caecal lumen form propagates in the large intestine and develops in cultures after isolation of the parasite. The shape is round or amoeboid, sometimes with formation of pseudopodia. The tissue form is located intercellular in organs of the host. Beside the two stages the parasite can develop an additional membrane when transforming into a resistant phase. Detailed light and transmission electron microscopy revealed the formation of cyst-like stages of *in vitro* cultivated histomonads.

The infection of host birds with *H. meleagridis* can occur directly or via the vector *Heterakis gallinarum* from contaminated faeces. We demonstrated in recent experiments that the infection with histomonads via the oral or cloacal route can lead to severe histomonosis in turkeys. Turkeys that suffer from histomonosis show ruffled feathers, drooping wings, apathy and sulphur coloured diarrhoea. The mortality of turkeys can be up to 100% as being reproduced in various experimental studies. Histomonosis in chickens causes milder clinical signs and a lower mortality, but the severity of the disease was described to resemble that of coccidiosis. The pathogenesis of histomonosis starts with the colonization of the parasite in the caecum leading to severe inflammation and necrosis. Following destruction of intestinal tissue the parasite infiltrates blood vessels and reaches the liver via the portal veins. As a consequence, areas of inflammation and destruction occur in the liver. At the final stage, the disease may become systemic when the parasite infiltrates various organs of the host.

Lesions caused by *H. meleagridis* are noticed as thickening of the caecal wall, bleedings in the mucosa and fibrinous masses in the lumen of the caecum. Liver lesions are found as round localized areas of necrosis that can be variable in size. Such lesions can be seen in turkeys and chickens, however, there may be a variation in the severity of pathological changes. For specific detection and localization in tissue samples, we established an *in situ* hybridization to distinguish *H. meleagridis* from other protozoa like *Tetratrichomonas gallinarum*.

The need to combat the disease is highly evident. So far, different prophylactic approaches against histomonosis were experimentally studied. Chemical compounds such as the aminoglycosid antibiotic paromomycin was formerly found to reduce the mortality of infected turkeys. In a more recent study, the prophylactic effect in turkeys could be confirmed but the drug showed no curative impact in already infected birds. However, it was demonstrated that the use of paromomycin as feed additive causes significantly higher frequency of antibiotic resistance of intestinal bacteria. Most recently, it was found that Nifurtimox, a nitrofurantoin, reduced liver lesions and mortality when used as feed additive but as already mentioned such chemicals are not licensed for the use in poultry in Europe and other countries. Plant-derived compounds from oregano, cinnamon, thyme, lemon, garlic, rosemary and other plants were tested for their effect against *H. meleagridis*. *In vitro* experiments using these compounds showed to inhibit the growth of cultured histomonads. However, in most of the studies no effect was observed when applied to prevent histomonosis in turkeys except minor impacts on organ lesions or mortality. Similar to this, artemisinin, a compound known for its activity against human malaria was found to have an effect *in vitro* but the prevention of histomonosis in chickens and turkeys was not possible.

In recent years, experiments investigating vaccination of chickens and turkeys were performed due to the demand to control histomonosis. We found that turkeys can be protected from fatal histomonosis by vaccination using clonal *in vitro* attenuated histomonads. Similar to this, vaccination prevents layers from a severe drop in egg production during experimental histomonosis. In continuative studies, the safety and stability of attenuation following consecutive *in vivo* passages could be shown. However, development of the immunity following vaccination was so far not elucidated. Therefore, the cellular immune reaction of chickens inoculated with attenuated or virulent histomonads was recently investigated by immunofluorescence to detect and quantify different populations of leukocytes using an automatic quantitative imaging system (TissueFAXS). It was found that organs of birds infected with virulent *H. meleagridis* revealed distinctly increased counts of B cells, T cells and monocytes/macrophages. In contrast, cell numbers of those leukocytes in tissue samples of chickens infected with attenuated histomonads were much lower, similar to counts in organs of the control birds.

In conclusion, histomonosis is a re-emerging disease in countries without admissions to administer effective chemotherapeutics, therefore new strategies to prevent the disease need to be applied. Recent experimental investigations demonstrated that vaccination using *in vitro* attenuated *H. meleagridis* effectively protects chickens and turkeys from histomonosis and is safe in use, arguing for the most promising approach to prevent histomonosis in poultry.





**“Un aggiornamento sull’uso del farmaco”**



## **PIANO NAZIONALE PER L' USO RESPONSABILE DEL FARMACO VETERINARIO E PER LA LOTTA ALL'ANTIBIOTICORESISTENZA IN AVICOLTURA - un aggiornamento.**

Rossella Pedicone

*Unaitalia- Via Torino 146-00184 Roma*

### **Summary**

Unaitalia, in collaborazione con SIPA, ha dato vita ad un Piano nazionale volontario avente come scopo la riduzione dell'uso dell'antibiotico in avicoltura, attraverso una razionalizzazione del suo impiego. Il Piano è stato diffuso dal Ministero della Salute- DGSAF- con nota del 28 luglio 2015. Le aziende che vi aderiscono, e che rappresentano circa l'80% della produzione di pollo e oltre il 90% di quella di tacchino in Italia, hanno assunto impegni precisi di autoregolamentazione, più stringenti rispetto a quanto suggerito nelle recenti linee guida europee. Una responsabile risposta ad un problema sempre più discusso e di cui cresce la percezione da parte del cittadino.

L'obiettivo fissato al 2015 di una riduzione del 15% è stato già raggiunto e superato, fino a sfiorare, con un meno 39,95%, l'obiettivo più avanzato del 2018 di un meno 40%. Tutto fa presupporre che verranno raggiunti risultati molto ambiziosi, riallineandoci ai più virtuosi Paesi europei.

### **CONCLUSIONI**

I risultati ottenuti sono indice di un crescente impegno, ma per percorrere il difficile tratto di strada che ancora resta è necessario che tutti i soggetti coinvolti a vario titolo, pubblico e privato, svolgano al meglio la propria parte.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. AAVV. (2008). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *OIE Terrestrial Manual*, Chapter 2.9.3., pp. 1185-1191.
2. Aarestrup FM, McDermott PF and HC Wegener. (2008). Transmission of antibiotic resistance from animals to humans. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ (Eds.), *Campylobacter*, ASM Press, Washington, DC, pp. 645-665.
3. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris LC and M Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Techn. Bull. Regist. Med. Technol.* 36: 493-496.

## TERAPIA IN AVICOLTURA - UNO SGUARDO SUL FUTURO

Roberto Cavazzoni

*Direttore AISA*

Il presente documento riassume i punti di vista dell'industria farmaceutica, in merito a dati di consumo, posizione delle industrie e strategie future.

I dati in volume della medicazione orale negli ultimi anni sono diminuiti sia a livello nazionale che europeo.

Tale obiettivo è stato raggiunto in quanto tutte le figure professionali coinvolte hanno fatto proprio l'atteggiamento olistico verso il fenomeno dell'antibiotico resistenza (AMR), pur cercando di mantenere e di difendere il più possibile i presidi terapeutici a disposizione dei Medici Veterinari, con particolare riferimento agli antimicrobici (antibiotici e antiparassitari).

Non sempre però l'industria veterinaria e tutti gli operatori della filiera, che hanno sempre avanzato proposte basate dal punto di vista tecnico e scientifico, hanno trovato un vero supporto da parte della medicina umana al fine di un confronto costruttivo. Attualmente tutti i referral – per Chinoloni, Cefalosporine III e IV generazione, Colistina in associazione ed ora procedura aperta per la sola Colistina – non aiutano certamente la classe medica veterinaria a scelte mirate, ponderate e razionali.

Per il futuro giocheranno ruoli importanti i monitoraggi delle stesure dei nuovi regolamenti Europei sui Farmaci Veterinari e sui Mangimi Medicati.

Alla stessa maniera sarà importante confrontarsi con la parte Politica Nazionale ed Europea per cercare il massimo allineamento sulle misure da implementare per combattere il fenomeno dell' Antibiotico Resistenza.

Diventa necessario implementare alcune strategie: aumentare la conoscenza da parte dei Medici Veterinari e degli allevatori di tutti gli strumenti a loro disposizione per la medicazione e per la profilassi, investire nel settore della profilassi e al tempo stesso difendere e, ove possibile, estendere le AIC presenti, difendere la Medicazione Orale e collaborare in misura maggiore con la medicina umana.





**ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA**

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Parma, 23 Settembre 2016



## **E.COLI ESPERIENZE CON VACCINO VIVO**

Alberti S.

*Zoetis Italia srl, via Andrea Doria 41M, Roma*

I ceppi di *Escherichia coli* patogeni aviari (APEC) causano ogni anno perdite importanti nell'industria avicola e sono di conseguenza motivo di trattamenti antibiotici per il controllo della mortalità da colibacillosi. Se nei polli da carne e tacchini gli antimicrobici disponibili siano vari, nelle ovaiole i possibili trattamenti si riducono in quanto è di fondamentale importanza il tempo di sospensione che non precluda la commercializzazione delle uova. Inoltre va tenuto conto che spesso *Escherichia coli* presenta fenomeni di resistenza che limitano il prontuario terapeutico. La sempre maggiore attenzione all'uso razionale degli antibiotici però impone un approccio multifattoriale che tenga conto di possibili alternative all'uso di antimicrobici.

Fino ad oggi poi si pensava che la resistenza verso colistina fosse codificata nel cromosoma (Olaitan et al., 2014), e faceva presumere che non ci fossero rischi di passaggio orizzontale di resistenza. Recenti studi hanno identificato la resistenza a colistina mediata da plasmide (Liu et al. 2015) questo potenzialmente potrebbe portare alla diffusione della resistenza ad altri batteri a livello mondiale (Hasman et al., 2015). Queste osservazioni oltre alla considerazione che colistina è l'antibiotico di elezione in casi di multiresistenza in umana hanno portato all'inteso dibattito della sua limitazione di uso in ambito veterinario.

Nell'ambito delle alternative per il controllo della colibacillosi oltre a programmi di vaccinazione che assicurino una buona immunità verso le patologie e condizioni ambientali che riducano al minimo gli insulti all'apparato respiratorio che possono esacerbare le infezioni da *E.coli* oggi è possibile utilizzare prodotti immunologici vivi o inattivati che permettono di stimolare l'immunità degli animali verso *E.coli* patogeni.

Mentre nelle ovaiole l'utilizzo di vaccini inattivati è in uso già per altre malattie ed il costo della mano d'opera è giustificato dal ciclo produttivo dell'animale, nei polli da carne è fondamentale evitare stress aggiuntivi in fase giovanile che potrebbero interferire con il rapido ciclo produttivo di questa categoria.

Già in uno studio multicentrico in Marocco su animali da carne era stato dimostrato che l'uso di un vaccino vivo delecto per il gene *aroA* con somministrazione spray alla schiusa è sicuro per gli animali. Alla analisi delle performance cliniche e produttive e confrontando animali vaccinati e non, gli animali immunizzati mostravano minor lesioni al macello, minor mortalità, maggior incremento di peso giornaliero, e minor necessità di trattamenti antimicrobici (Mombarg et al 2014).

Nel 2014 nuove esperienze in Germania sempre nell'ottica di diminuire l'uso di antimicrobici sono state portate avanti in allevamenti che nonostante le moderne attrezzature e la localizzazione in aree a bassa densità avicola presentavano casi di colibacillosi tra la 3° e la 5 settimana.

Dopo aver controllato i parametri ambientali, ventilazione, igiene degli ambienti e delle linee di abbeverata e il programma luce, il problema continuava ad essere riferibile a infezioni da *E.coli* di vari sierotipi O78, O1, O18, n.t ed anche ceppi diversi in cicli differenti.

Introducendo la vaccinazione con vaccino vivo delecto per il gene *aroA* via somministrazione

spray all'arrivo si è potuto passare da 10 giorni di trattamento medi dei cicli precedenti a 2 giorni, migliorando la mortalità del gruppo e diminuendo la percentuale di scarti al macello. L'utilizzo di vaccini vivi per E.coli anche nel pollo da carne sebbene abbia un ciclo breve, in allevamenti

che presentano problematiche ricorrenti dovute a colibacillosi in un programma di controllo delle condizioni ambientali di allevamento ed di vaccinazione mirato verso i principali patogeni respiratori permette di ridurre la necessità di trattamenti antibiotici e migliorare le performance produttive degli animali.

## **BIBLIOGRAFIA**

Düngelhof et al., 2014 Deutliche Reduktion antibiotischer Behandlungen durch Einsatz einer E.coli Lebendvaccine beim Broiler ein Fallbericht *Prakt Tierarzt* 95: 158-163, 2014  
Hasman et al., 2015. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill.*

2015;20(49):pii=30085. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085>

Liu et al., 2015. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet*, 16, 161-168.

Mombarg et al 2014. Safety and efficacy of an aroA-deleted live vaccine against avian colibacillosis in a multicentre field trial in broilers in Morocco *Avian Pathology*, 2014 Vol. 43, No. 3, 276–281, Olaitan et al., 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria.

*Frontiers Microbiol.*, 5, 1-18.

## SUI TESTICOLI SOPRANNUMERARI NEI GALLETTI DI LINEE LEGGERE SUPERNUMERARY TESTES IN CHICKENS

Banco B., Ferrari N., Cocchi L., Formenti N., Grieco V., Gallazzi D., Calligarich C., Grilli G.

*Dipartimento Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10 – 20133 Milano*

### Summary

Supernumerary testes (ST) in domestic fowl were investigated. Ninety-three groups belonging to eight genetic breeds, with a total number of 443,953 cockerels, were controlled at the moment of caponizing. The results show that frequencies of ST varied between 0.1 to 1.6% with a significant effect of the genetic lines. The causes of triorchidism are discussed.

### INTRODUZIONE

Le segnalazioni di testicoli soprannumerari nel pollame domestico sono molto scarse in letteratura (Katiyar *et al.*, 1986; Hocking, 1992; Onu, 2012), principalmente per il fatto che i galletti, sia giovani che adulti, non sono sottoposti in numero rilevante a controlli autoptici di routine a livello genitale. D'altra parte il controllo dell'apparato genitale maschile interessa solo i gruppi da riproduzione. In Italia è però diffusa la castrazione chirurgica del galletto di poche settimane di vita per la produzione del cappone natalizio, e negli ultimi anni durante questo intervento la visualizzazione delle gonadi maschili ha portato alcuni operatori a notare con una certa frequenza la presenza di testicoli soprannumerari, osservazione in contrasto con gli scarsi dati bibliografici disponibili.

Negli studi che trattano questo argomento, compresi quelli riferiti ad altre specie aviarie (McFarland, 1965; Witt e Bautista, 2011) sono riportati sia casi con coinvolgimento del testicolo destro (Katiyar *et al.*, 1986), sia di quello sinistro (Hocking, 1992). I testicoli accessori vengono descritti, quanto a struttura e consistenza, come normali pur essendo di dimensioni inferiori, e viene inoltre riferita una fertilità inalterata per alcuni dei soggetti interessati (Hocking, 1992). Va però sottolineato che secondo Nickel *et al.* (1973) negli uccelli il testicolo di sinistra è di regola più grande di quello di destra, ed entrambi sono collocati in corrispondenza del polo craniale del rene. In età prepubere il testicolo di destra è lievemente più craniale rispetto al sinistro (Gallazzi, osservazione personale).

Mentre nei broilers il problema dei testicoli soprannumerari non sussiste, in quanto macellati in età prepubere, nei maschi utilizzati per la produzione del cappone (in genere soggetti di linee genetiche selezionate per la produzione di uova) la presenza di testicoli soprannumerari non sempre visibili dall'operatore comporta l'incompleta neutralizzazione sessuale, influenzando quindi i dati della produzione e delle caratteristiche organolettiche della carne. Infatti la persistenza di testicoli soprannumerari vicarianti le funzioni di quelli asportati chirurgicamente comporta l'estrinsecazione dei caratteri sessuali secondari tipici del maschio, annullando in parte o in tutto l'effetto della castrazione.

Tale problema (incompleta neutralizzazione sessuale) non è di poco conto in Italia in quanto la produzione del tradizionale cappone natalizio è molto consistente. Non sono stati riscontrati dati ufficiali nei resoconti statistici delle produzioni avicole nazionali, ma, da una nostra indagine presso le principali aziende avicole italiane, risulta che annualmente la produzione del cappone raggiunge qualche milione di unità.

## MATERIALI E METODI

Al fine di controllare la presenza dei testicoli soprannumerari (TS) nei galletti di linee leggere da uova, in Italia tipicamente impiegati per la produzione del cappone natalizio, sono state controllate otto linee genetiche differenti (qui indicate con sigle di fantasia) e precisamente: 50 gruppi della linea genetica A per un totale di 228.928 maschi, 23 gruppi di linea genetica B per un totale di 155.886 soggetti, 6 gruppi di linea genetica C con 31.106 soggetti capponati, 4 gruppi di linea genetica D per un totale di 10.154, 7 gruppi di linea genetica E per un totale di 15.884 soggetti e infine tre piccoli gruppi costituiti da 272 soggetti di linea genetica F, 145 di linea genetica G e 1578 di linea genetica H. Dei 443.953 soggetti totali, 296.878 sono stati capponati nell'estate 2014, mentre 147.075 nell'estate 2015. I soggetti sono stati capponati a un'età compresa tra i 18 e i 30 giorni da due operatori esperti che agivano in coppia e annotavano la presenza di testicoli soprannumerari rilevati durante la procedura. La differente età dell'intervento dipendeva dalla linea genetica.

L'individuazione di TS negli stessi gruppi è risultata sovrapponibile tra i due operatori, ma va precisato che il numero totale risulta probabilmente sottostimato per l'oggettiva difficoltà di individuare i TS, stante talvolta le loro piccolissime dimensioni, specie per quelli controlaterali rispetto al lato dell'incisione, normalmente effettuata a destra .

I dati registrati sono stati analizzati statisticamente attraverso il programma R 3.3.1 tramite un modello generalizzato lineare, con distribuzione binomiale, in modo da verificare l'effetto della linea genetica sulla percentuale di testicoli soprannumerari. Il limite di significatività considerato è  $P < 0,05$ .

Di ogni linea genetica sono stati prelevati alcuni campioni di TS da sottoporre ad esame istologico al fine di definire la struttura microscopica del tessuto. Questi ultimi comprendevano 40 TS prelevati al momento della capponatura e perciò ancora immaturi e un TS prelevato da un soggetto adulto nel quale era stata osservata la presenza di un TS al momento della capponatura, che era stato lasciato in sede fino al raggiungimento dell'età adulta e alla macellazione (PA 79/14). Inoltre la nostra casistica includeva 8 campioni prelevati da soggetti impuberi privi di TS e 2 da galli adulti (campioni prelevati al macello), fungenti da controllo negativo. Tutti i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. I TS e quelli di animali impuberi normali, date le loro ridotte dimensioni (circa 8-10x2-3 mm i testicoli normali e circa 1x2-3 mm i soprannumerari, Fig. 1), sono stati fissati in formalina tal quali, per intero. I testicoli normali di gallo, più voluminosi, sono stati inizialmente sezionati in due metà. Tutti i campioni sono rimasti in formalina tamponata al 10%, per almeno 3 giorni, per garantire una fissazione ottimale. Successivamente si sono ottenute sezioni multiple di 0,3-0,4 mm di spessore dei testicoli maturi, mentre i testicoli so-

prannumerari ed i testicoli immaturi/impuberi, date le loro ridotte dimensioni, sono stati processati interi. I campioni sono stati inclusi in paraffina, dopo processazione in scala crescente di alcoli e chiarificazione in xilene. Da ciascun blocchetto così ottenuto sono state infine prodotte sezioni seriate di 5 micron di spessore. Una di tali sezioni è stata colorata con Ematossilina-Eosina ed è stata destinata all'esame istologico.

## RISULTATI

Come risulta dalla Tab. I la presenza di TS è notevolmente differente a seconda della linea genetica considerata.

LINEE GENETICHE	N. GRUPPI	N. SOGGETTI	TS	%
A	50	228.928	516	0,23
B	23	155.886	1972	1,27
C	6	31.106	251	0,81
D	4	10.154	10	0,10
E	7	15.884	71	0,45
F	1	272	2	0,74
G	1	145	1	0,69
H	1	1.578	25	1,58

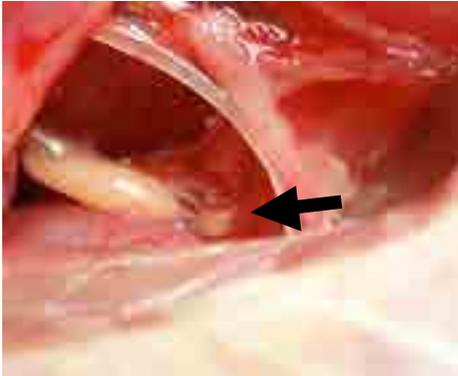
**Tabella 1.** Composizione e frequenza di testicoli soprannumerari nelle linee genetiche.

L'analisi statistica ha evidenziato un effetto significativo ( $\text{dev} = 168$ ,  $g.l. = 7,9$ ,  $p < 0,001$ ) della linea genetica sulla percentuale di TS. In particolare, tra le linee genetiche con la più alta incidenza di TS vi sono la linea B (1,27%) e la linea C (0,81%). La linea genetica risultata più sensibile al problema, per quanto il numero di animali su cui sono disponibili i dati sia molto inferiore rispetto alle due linee precedenti, era rappresentata dalla linea H, le cui percentuali riportate raggiungono l'1,58%.

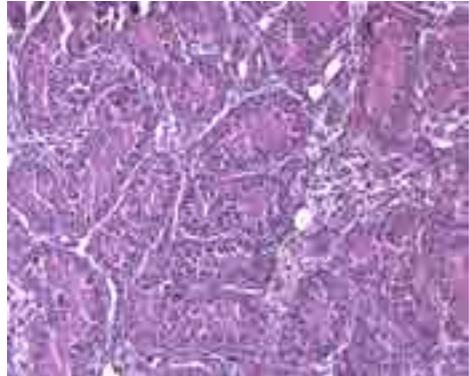
All'analisi istologica i testicoli soprannumerari ed i testicoli immaturi/impuberi mostravano caratteristiche sovrapponibili (Fig. 2 e 3). Nei campioni esaminati era possibile riconoscere sia la tunica albuginea esterna che il parenchima testicolare ed i tubuli dell'epididimo. Il parenchima testicolare era costituito da numerosi tubuli seminiferi, circondati da una variabile quantità di stroma interstiziale, all'interno del quale era possibile identificare un limitato numero di cellule di Leydig, di forma poligonale, e numerosi vasi sanguigni. I tubuli seminiferi apparivano rivestiti da cellule del Sertoli, di aspetto triangolare, poggianti sulla spessa membrana basale tubulare. Frammiste a queste ultime, si osservava la presenza di un limitato numero di cellule rotonde, identificate come spermatogoni. Il lume dell'epididimo era vuoto. In nessun caso vi era alcuna differenza morfologica tra il testicolo normale e il testicolo soprannumerario, che differiva soltanto per le dimensioni assai ridotte.

I testicoli normali di gallo erano invece caratterizzati da ampi tubuli seminiferi con un lume ben definito, circondati da scarso stroma interstiziale, e un limitato numero di cellule di Leydig. All'interno dei tubuli seminiferi si osservava la linea seminale completa, nella quale erano identificabili spermatogoni, spermatociti, spermatidi e numerosi spermatozoi. Questi ultimi erano abbondantemente presenti, inoltre, all'interno del lume dei tubuli dell'epididimo (Fig. 4).

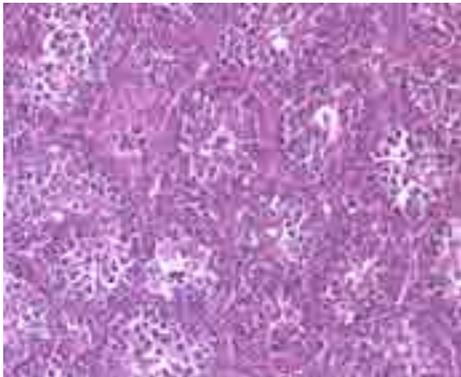
Per quanto riguarda il campione PA 79/14 (Fig. 5), che faceva riferimento al soggetto adulto nel quale era stata riscontrata la presenza di un testicolo soprannumerario al momento della macellazione, le gonadi primarie ed il piccolo testicolo soprannumerario mostravano le medesime caratteristiche istologiche e lo stesso grado di maturazione della linea seminale.



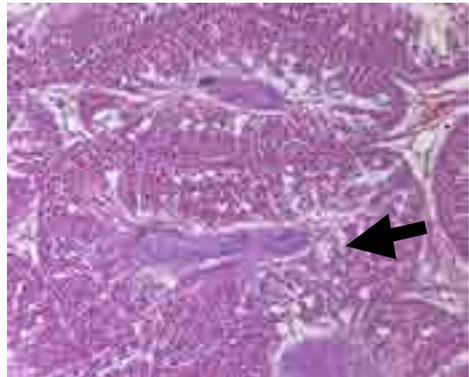
**Fig. 1.** Apertura cavità celomatica, lato dx: al polo craniale del testicolo principale si osserva la presenza di un piccolo testicolo soprannumerario (freccia).



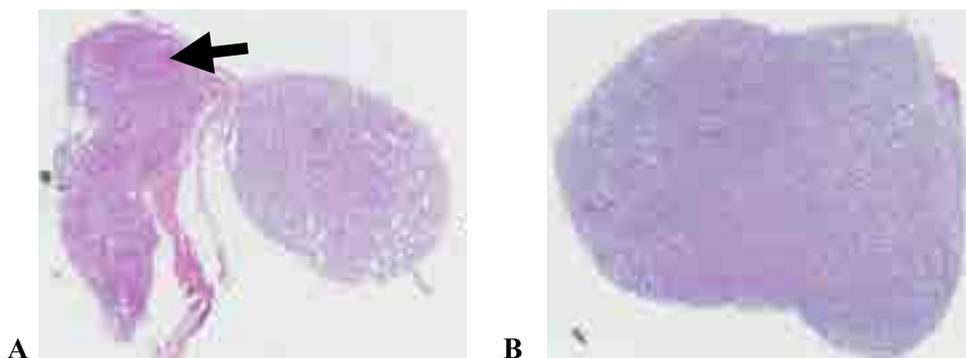
**Fig. 2.** Testicolo soprannumerario, soggetto di 30 gg: i tubuli seminiferi sono ben conformati, hanno lume assai ridotto e linea germinale incompleta. Si osservano numerose cellule del Sertoli, lungo la membrana basale, e un limitato numero di spermatogoni. Ematossilina Eosina, 200x



**Fig. 3** Testicolo impubere (immaturo), soggetto di 30 gg: i tubuli seminiferi sono ben conformati, hanno lume assai ridotto e linea germinale incompleta. I tubuli sono rivestiti da uno strato di cellule del Sertoli, appoggiate alla lamina basale, e da uno scarso numero di spermatogoni. Ematossilina Eosina, 200x.



**Fig. 4.** Testicolo maturo di gallo: tubuli seminiferi con linea seminale completa. All'interno del lume tubulare si osservano numerosi spermatozoi (freccia). Lo stroma interstiziale è assai ridotto. Ematossilina Eosina, 100x



**Fig. 5.** PA 79/14, gallo adulto. Scansione. Testicolo soprannumerario (A) e testicolo normale (B). A carico di entrambi i tessuti si osserva la presenza di numerose strutture tubulari (tubuli seminiferi) che costituiscono il parenchima di entrambi i testicoli. Nel testicolo soprannumerario si osserva, inoltre, la presenza di un'ampia porzione di epididimo (freccia). Ematossilina Eosina.

## DISCUSSIONE

Pur essendo difficile stabilire con certezza quale percentuale dei mancati capponi a fine ciclo di allevamento sia imputabile a errore chirurgico per incompleta ablazione delle gonadi e quale a presenza di testicoli soprannumerari, l'attenzione degli operatori durante la fase di capponatura ha permesso di consolidare l'ipotesi che la presenza di tali testicoli sia stata sottostimata per anni e possa essere in realtà un fattore che incide sulla casistica riportata. Anche questo nostro stesso lavoro non può essere considerato preciso in modo assoluto per quanto concerne il numero dei TS rilevati, per la difficoltà di rilevare i TS controlaterali rispetto al lato dell'incisione chirurgica, per le dimensioni dei TS talvolta ridotte al limite della visibilità e per la soggettività legata all'operatore. Comunque, proprio questi dati hanno portato gli operatori del settore a sospettare che il problema dei testicoli soprannumerari fosse più esteso di quanto si pensasse in passato. Per quanto venga spesso riferito dai macellatori che anche in caso di evidente estrinsecazione di caratteri sessuali secondari (quali ad esempio la cresta rossa) in molti casi l'aspetto e le caratteristiche organolettiche della carne rimangono quelle del cappono, è chiaro che il problema può raggiungere un'entità non trascurabile per le aziende produttrici.

Il presente studio ha permesso inoltre di ipotizzare una componente genetica che influenzi una diffusione del problema molto superiore in determinate linee genetiche rispetto ad altre.

L'esame istologico ha permesso di confermare i precedenti studi sull'argomento, nei quali veniva affermata la persistenza di un aspetto microscopico del parenchima del tutto sovrapponibile a quello dei testicoli normali e la persistenza di funzionalità spermatogenica dei TS, come confermato dal campione PA 79/14 (Fig. 5), nonostante le differenze macroscopiche in quanto a dimensioni e consistenza (Katiyar *et al.*, 1986; Shrivastava *et al.*, 1988; Onu JE, 2012). Anche in campo umano è stato dimostrato che in più della metà dei soggetti con triorchidismo l'attività spermatogenica è conservata (Spranger *et al.*, 2002; Savas *et al.*, 2009).

L'eziologia di questo fenomeno non è ancora chiara, anche se già nel 1992 era stata suggerita da Hocking la possibilità che fosse associato ad un difetto congenito piuttosto diffuso nel pollame domestico e negli uccelli in generale (McFarland 1965; Katiyar *et al.*, 1986; Shrivastava *et al.*, 1988; Graves, 2004; Witt e Bautista, 2011; Onu, 2012). Tuttavia saranno necessari ulteriori studi per approfondire l'argomento.

## CONCLUSIONI

La nostra indagine ha permesso di trarre alcune conclusioni sulla presenza dei TS nei galletti di linea leggera, che possono essere sinteticamente così riportate:

1. Esiste una significativa differenza tra le diverse linee genetiche ( $P < 0,05$ ). Infatti in alcuni ceppi genetici il fenomeno è fino a 15 volte più frequente: le percentuali variano da 0,10 a 1,58% (Tab. I).
2. Bisogna tener conto di una inevitabile sottostima del dato dovuta alla difficoltà di individuare i TS più piccoli nelle condizioni di campo in cui si è operato.
3. Morfologicamente i testicoli soprannumerari si presentano più piccoli ma istologicamente identici a quelli normali, come riferito dagli altri autori che hanno studiato l'argomento (Hocking, 1992; Onu, 2012).
4. L'eziologia del fenomeno è ancora da chiarire. Secondo la maggior parte degli autori il triorchidismo sembra essere legato ad un difetto congenito, come anche riportato in medicina umana (Hocking, 1992; Spranger *et al.*, 2002; Savas *et al.*, 2009). Nei casi da noi rilevati non è stato possibile stabilire se si trattasse di triorchidismo di tipo A, cioè con connessione del TS al dotto deferente, o di tipo B, senza questa connessione. Nelle specie aviarie domestiche e selvatiche il triorchidismo è riportato sporadicamente, mentre nella casistica da noi considerata sembra che la pressante selezione genetica cui alcuni ceppi sono sottoposti abbia giocato un ruolo predisponente al fenomeno.

*Ringraziamenti: gli autori sono grati alla signora Antonia Albonetti per la fattiva partecipazione nella raccolta dei dati di campo.*

## BIBLIOGRAFIA

- Graves GR. Testicular volume and asymmetry are age-dependent in Black-throated Blue Warblers (*Dendroica caerulescens*). *Auk*. 2004. 121:473–485.
- Hocking PM. Bilateral testicular asymmetry and supernumerary testis in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *British Poultry Science*. 1992. 33: 455-460.
- Jones TC, Hunt RD. *Veterinary Pathology*. 5<sup>a</sup> edizione, Lea e Febiger Eds, Philadelphia. 1983. p. 1562.
- Katiyar AK, Shrivastava AB, Awadhiya RP, Vegad JL. Supernumerary testis in a domestic fowl. *Veterinary Record*. 1986. 118: 306-307.

- McFarland LZ. A triorchid Japanese Quail. *Poultry Science*. 1965. 44:306–307.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Trattato di anatomia degli animali domestici. 1<sup>^</sup> edizione, Casa editrice Ambrosiana, Milano. 1984. Vol V: pp.76-77.
- Onu JE. Type B triorchidism in an adult indigenous fowl (*Gallus gallus domesticus*) in Sokoto, Nigeria. Case report. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. 2012. 10(1):32-35.
- Witt CC, Bautista E. Triorchidism in a hummingbird. *The Wilson Journal of Ornithology*. 2011. 123(3):632-635.
- Savas M, Yeni E, Ciftci H, Cece H, Topal U, Utangac MM. Polyorchidism: a three-case report and review of the literature. *Andrologia*. 2009. 42:57–61.
- Shrivastava AB, Katiyar AK, Awadhiya RP, and Vegad JL. Triorchidism in a domestic-fowl. *Veterinary Record*. 1988. 123:110.
- Spranger R, Gunst M, Kuhn M. Polyorchidism: a strange anomaly with unsuspected properties. *Journal of Urology*. 2002. 168(1):198.

# **VALUTAZIONE DELL'EFFETTO SINERGICO DELLA COINFEZIONE DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA H9N2 E DEL CEPPINO VELOGENO DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE IN GALLINE OVAIOLE IN PRODUZIONE**

Bonfante F., Mazzetto E., Leopardi S., Maniero S., Salomoni A., Terregino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*

## **Summary**

Avian influenza (AI) and Newcastle disease virus (NDV) are two of the deadliest diseases of poultry. In the Middle East an ongoing epizootic of low pathogenicity avian influenza (LPAI) H9N2 has favored the occurrence of NDV-AI mixed infections in commercial and backyard farms of layers, broilers and turkeys. In Israel, vaccination against virulent NDV (vNDV) is mandatory but even in the presence of good flock immunity, vaccinal breaks are often reported in association with H9N2 infections.

It has been speculated that H9N2 viruses can act as immunodepressive agent or cause an epithelial damage at the level of the respiratory tract that in turn facilitates secondary bacterial or viral infections. In this study, we evaluated how the exposure of specific pathogen free (SPF) chickens to a H9N2 challenge interacts with a subsequent vNDV infection. Moreover, to understand whether NDV outbreaks in vaccinated flocks in the field might be actually associated with a prior H9N2 or concomitant infection, we reproduced in a controlled setting the NDV vaccination protocol for laying hens adopted in Israel, and hence compared clinical, virological and productive data after the challenge of birds with either NDV alone or the combination of H9N2/NDV.

## **INTRODUZIONE**

L'influenza aviaria e la malattia di Newcastle sono due delle più devastanti malattie infettive dell'avicoltura e si presentano come problematiche caratterizzate da un forte impatto in termini economici e di salute pubblica veterinaria.

A partire dagli anni 2000 virus influenzali a bassa patogenicità del sottotipo H9N2 hanno causato frequenti epidemie in diverse regioni asiatiche, in Medio Oriente, nel Nord Africa, e sporadicamente anche in Europa.

In particolare in Israele, la circolazione del virus H9N2 è stata associata con cali dell'ovodeposizione ed episodi di mortalità da NDV in allevamenti di galline ovaiole e riproduttori legati a rotture vaccinali (Banet-Noach et al., 2007) hundreds of H9N2 viruses have been isolated from all types of domestic birds. Although H9N2 is a low-pathogenicity virus, disease has been observed in all types of poultry in the field. Clinical signs ranged from very mild disease to high morbidity and mortality when the virus was associated with a secondary pathogen. Because of the wide range of the virus and the great losses it caused, initially a local vaccination program was implemented, but mass vaccination was quickly authorized. A local strain, isolated in 2002 was selected and is currently in use as an inactivated vaccine. An intensive operation is in progress to characterize the isolates. Several genes (hemagglutinin [HA], neuraminidase, nonstructural protein, nucleoprotein, and matrix. Questi epi-

sodi risultano difficilmente spiegabili alla luce di un diffuso programma di vaccinazione contro NDV molto efficace ed in grado di conferire titoli anticorpali elevati fin dal primo mese di età, coprendo le diverse fasi produttive degli animali. Nell'ambito del progetto europeo NADIV finanziato dall'iniziativa Aniwha-Eranet, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) ha intrapreso una collaborazione con il Kimron Veterinary Institute, Israele, per approcciare la problematica della co-circolazione dei due virus al fine di comprendere la reale portata del fenomeno da un punto di vista clinico, virologico e per migliorare il controllo della malattia.

La ricerca si pone in particolare due obiettivi: a) comprendere come i due agenti infettivi interagiscano dal punto di vista clinico e virologico al variare della dose di NDV; b) verificare se il protocollo vaccinale applicato in campo contro la malattia di Newcastle sia in grado di proteggere ovaiole in deposizione, in presenza di H9N2.

Particolare attenzione è stata rivolta a valutare l'entità della replicazione dei virus a livello dell'apparato riproduttore, in associazione ad una accurata valutazione di parametri produttivi quali la quantità delle uova deposte e lo spessore del guscio.

## **MATERIALI E METODI**

### *Virus e animali*

I virus utilizzati per le infezioni sperimentali sono il virus velogeno di NDV (vNDV), genotipo VII e ceppo chicken/Israele/Maaleh-Hachamsha/998/2011 e il virus LPAI H9N2 A/chicken/Israele/1163/2011. Per questo studio sono state testate 170 galline ovaiole SPF di razza *White Leghorn*, accasate in isolatori a pressione negativa con filtri High Efficiency Particulate Air Filter (HEPA) all'interno delle strutture IZSve. Cinquanta di queste sono state allevate con un regime alimentare specifico per pollastre e un programma di ore di luce controllato in modo da favorire l'inizio ed il mantenimento dell'ovodeposizione. Nei gruppi destinati all'ovodeposizione, a diciotto settimane di età, sono stati inseriti i nidi per la cova. La sperimentazione è stata condotta in ottemperanza con quanto previsto dal D. L.vo 26/2014 e dalle linee guida nazionali ed internazionali sul benessere animale, previo parere favorevole del comitato etico dell'IZSve.

### *Disegno sperimentale*

Nel primo esperimento, sei gruppi di dieci galline ovaiole di sei settimane, sono stati infettati con dosi scalari di vNDV, tramite somministrazione oro-nasale di 100 µl di liquido allantoideo contenente da  $10^1$  a  $10^6$  EID<sub>50</sub>. Lo stesso protocollo è stato applicato ad un secondo gruppo di ovaiole infettate tre giorni prima con il virus H9N2. I due gruppi sono stati identificati rispettivamente a seconda del tipo di infezione e della dose di NDV somministrata (i.e. NDV  $10^1$ - $10^6$  o H9-NDV  $10^1$ - $10^6$ ). La valutazione clinica dei gruppi è avvenuta quotidianamente mentre la raccolta dei tamponi tracheali e cloacali è stata programmata a 2, 4, 6 e 8 giorni post-infezione (p.i.) NDV. Il sangue per la valutazione della sieroconversione è stato prelevato a ventuno giorni dall'infezione.

Nel secondo esperimento cinque gruppi da dieci galline ovaiole ciascuno, sono stati vaccinati sia con un vaccino per ND inattivato registrato in Israele somministrato (0,5 ml) con puntura sottocutanea nella parte distale del collo, sia con un vaccino vivo, contenente il ceppo VH di NDV (di produzione israeliana), nebulizzato con pistola spray all'interno degli isolatori, in modo da somministrare gocce del diame-

tro di 50-150  $\mu\text{m}$ . Lo schema vaccinale adottato ha previsto dieci somministrazioni a partire da un giorno di vita sino alla trentesima settimana, al fine di riprodurre il protocollo vaccinale utilizzato in campo in Israele.

Prelievi di sangue per valutare la sieroconversione sono stati programmati a 4, 6, 18 e 32 settimane. Alla trentaduesima settimana due gruppi classificati come NDV-a e NDV-b sono stati infettati con il ceppo vNDV di challenge per via oculo-nasale con 100  $\mu\text{l}$  di liquido allantoideo contenente  $10^6$  EID<sub>50</sub>, e altri due gruppi definiti H9-a e H9-b oltre ad essere infettati allo stesso modo con il virus di challenge vNDV, sono stati infettati tre giorni prima con una dose di  $10^6$  EID<sub>50</sub> di H9N2 per via oro-nasale. Il quinto gruppo è stato regolarmente vaccinato ma non infettato in quanto controllo per la produzione di uova.

Tutti i gruppi sono stati monitorati regolarmente per la registrazione dei dati clinici. Le ovaiole dei gruppi H9-a e NDV-a sono state campionate per la raccolta di tamponi tracheali e cloacali e dei principali tratti dell'ovidotto (infundibolo, magno, istmo e utero) a 2, 4 e 7 giorni p.i. NDV. I gruppi H9-b e NDV-b sono stati destinati esclusivamente alla raccolta giornaliera delle uova, in modo da limitare eventuali variazioni qualitative e quantitative nell'ovodeposizione legate a stress da manipolazione. Le uova sono state raccolte a partire dalla settimana precedente l'infezione fino alla fine dello studio, con l'obiettivo di valutare l'impatto delle infezioni sperimentali in termini di produttività e alterazione dello spessore del guscio. Inoltre, una volta infettati gli animali, ogni uovo è stato campionato per la raccolta dell'albume come matrice per la ricerca di NDV ed H9N2. Lo spessore del guscio è stato misurato al suo polo ottuso, previo distacco della membrana testacea interna, utilizzando uno specifico calibro di precisione. Gli animali dei gruppi NDV-b e H9-b sono stati sottoposti a prelievo di sangue per monitorare la sieroconversione a 21 giorni dall'infezione.

### *Sierologia*

Il test di inibizione dell'emoagglutinazione è stato eseguito utilizzando l'antigene omologo di ognuno dei due virus di challenge e l'antigene vaccinale VH, secondo le procedure ufficiali del manuale OIE (OIE, 2014).

### *Virologia*

I tamponi, i tratti di ovidotto e gli albumi delle uova sono stati processati per effettuare l'estrazione dell'RNA. Il rilevamento del gene M dell'Influenza A è stato eseguito tramite metodica di real time RT-PCR (rRT-PCR) utilizzando sonda e primers riportati da Spackman *et al.*, (Spackman *et al.*, 2002) H5 and H7 hemagglutinin subtype-specific probe sets were developed based on North American avian influenza virus sequences. The RRT-PCR assay utilizes a one-step RT-PCR protocol and fluorogenic hydrolysis type probes. The matrix gene RRT-PCR assay has a detection limit of 10 fg or approximately 1,000 copies of target RNA and can detect 0.1 50% egg infective dose of virus. The H5-and H7-specific probe sets each have a detection limit of 100 fg of target RNA or approximately  $10^3$  to  $10^4$  gene copies. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay were directly compared with those of the current standard for detection of influenza virus: virus isolation (VI mentre per il rilevamento del gene F dell'NDV è stata utilizzata la sonda FAM (LpromGB) e la coppia di primers NDF e NDR, gentilmente forniti da Animal and Plant Health Agency, UK.

## *Immunologia*

Da ogni tratto dell'ovidotto sono stati prelevati tre frammenti di tessuto per la coltura *ex vivo* di espianti. Dopo 48 ore di incubazione a 37°C il surnatante di ogni espianto è stato raccolto, chiarificato, e conservato a -20°C. I campioni sono stati successivamente inviati al CODA-CERVA (Veterinary and Agrochemical Research Centre, Belgio) per la quantificazione tramite metodica ELISA delle immunoglobuline contro NDV del tipo G, M ed A.

## **RISULTATI**

### *Primo esperimento*

La pre-esposizione degli animali al virus H9N2 ha portato ad un aumento della mortalità a partire dalla dose di  $10^3$  EID<sub>50</sub>. Inoltre in presenza di H9N2 la minima dose infettante di NDV, valutata in termini di eliminazione virale e sierconversione, è calata da  $10^2$  a  $10^1$  EID<sub>50</sub> (**Fig. 1**). Per quanto riguarda l'inizio dell'eliminazione virale a livello tracheale, nei gruppi H9-NDV il virus è stato rilevato in media 2,8-0,4 giorni più tardi rispetto ai gruppi NDV, registrando un ritardo inversamente proporzionale alla dose di NDV. Questa differenza in termini di tempo è risultata statisticamente significativa alle dosi  $10^1$ - $10^3$  EID<sub>50</sub>. Analogamente il tempo medio di insorgenza della mortalità nei gruppi H9-NDV è stato in media pari o superiore a quello registrato nei gruppi NDV, esclusa la dose  $10^6$  EID<sub>50</sub>.

### *Secondo esperimento*

A partire dalla quarta settimana di età i titoli medi di HI contro i virus di challenge e vaccinale hanno raggiunto un valore pari a 8 log<sub>2</sub>. Tra quattro e trentadue settimane, l'innalzamento del titolo anticorpale è avvenuto gradualmente raggiungendo un valore di plateau tra 8,1-9,0 log<sub>2</sub>, rispettivamente per il virus di challenge ed il ceppo VH.

Indipendentemente dall'esposizione al virus H9N2, tutti gli animali sono sopravvissuti al challenge da NDV. I gruppi coinfezti H9/NDV hanno manifestato moderati segni clinici quali penne arruffate, abbattimento, inattività, edema perioculare, e infiammazione della congiuntiva, con un aggravamento dello stato di abbattimento tra 5-9 giorni post-challenge H9N2. Nei gruppi infetti NDV è stato registrato un lieve calo dell'attività tra 3-7 giorni post-infezione NDV.

Tutti i tamponi e tutti gli organi di entrambi i gruppi NDV e H9/NDV sono risultati negativi alla rRT-PCR per NDV, mentre tutti i tamponi tracheali e gran parte dei tamponi cloacali sono risultati positivi per influenza nel gruppo H9/NDV (**Tab. 1**). La replicazione del virus H9N2 a livello dei quattro tratti dell'ovidotto è stata rilevata tramite rRT-PCR ai giorni 5 e 7 post-infezione rispettivamente in 2/4 e 2/3 dei soggetti campionati.

Le analisi sierologiche non hanno identificato alcuna sierconversione a 21 giorni p.i. verso il virus di challenge NDV, confermando quanto rilevato sul piano virologico.

I surnatanti dei diversi espianti hanno riportato valori di assorbanza per IgA ed IgM sempre inferiori ai valori registrati per le IgG in ogni tratto analizzato ed in ogni tempo di prelievo. Ad una analisi statistica preliminare, i surnatanti ottenuti da animali del gruppo H9/NDV hanno riportato un rialzo significativo delle IgG contro NDV al giorno 7 post-challenge H9N2, seguito da un calo netto al giorno 10 post-infezione,

mentre nel gruppo NDV un rialzo significativo si è registrato solo al 10° giorno. Il numero di uova deposte nel gruppo H9/NDV è calato costantemente per 6 giorni a partire dal giorno 3 post-infezione H9N2, registrando valori significativamente inferiori alla media di deposizione registrata nella settimana precedente il challenge. La produzione totale di uova nei 25 giorni precedenti l'infezione rispetto ai 25 giorni seguenti l'infezione è calata del 12,1% per il gruppo NDV e del 18,6% nel gruppo H9/NDV. I valori medi degli spessori dei gusci delle uova misurati nella settimana precedente all'infezione sono stati confrontati con i valori medi rilevati nelle tre settimane a seguire. Le uova raccolte nel gruppo H9-b hanno registrato una diminuzione dello spessore pari al 4,3%, 2,4% e 5,8% rispettivamente nella prima, seconda e terza settimana post infezione, mentre nel gruppo NDV-b la diminuzione è stata del 1,9%, 0,2% e 4,14%.

## DISCUSSIONE

Il primo studio ha evidenziato come l'esposizione di galline SPF ad un virus LPAI del sottotipo H9N2 possa esercitare su una superinfezione da NDV un duplice effetto, di sinergia ed al contempo di interferenza virale. In presenza di H9N2 è stato infatti osservato un abbassamento della dose minima infettante di vNDV, da  $10^2$  a  $10^1$  EID<sub>50</sub>. La sinergia si è inoltre manifestata come incremento della mortalità, un fenomeno ascrivibile ad una esacerbazione della patologia, ed ampiamente riportato in letteratura per studi di co-infezione virali-batteriche ma in apparente contrasto con quanto descritto da Costa-Hurtado, secondo la quale una pre-esposizione a virus NDV mesogeno o velogeno riduce la mortalità di una successiva infezione da virus aviario ad alta patogenicità (Costa-Hurtado et al., 2015, 2014).

L'interferenza virale è stata invece osservata come un posticipo della replicazione del virus NDV e della sintomatologia e mortalità ad essa associate. Tali evidenze sperimentali confermano in parte quanto dimostrato dagli studi di Ge *et al.*, (Ge et al., 2012) secondo i quali i virus influenzali a bassa patogenicità hanno un vantaggio competitivo rispetto a virus NDV cresciuti simultaneamente in embrioni di pollo SPF. Tale vantaggio è riportato aumentare nel caso in cui il virus influenzale venga inoculato prima del virus NDV.

Dal punto di vista teorico, esistono diverse spiegazioni per giustificare il fenomeno di interferenza virale osservato nei nostri studi. La replicazione virale influenzale, induce infatti la produzione di interferone gamma, una molecola in grado di stimolare la sintesi di particolari proteine capaci di arrestare a diversi stadi il ciclo di replicazione virale. Inoltre, NDV ed AI, condividono alcuni recettori cellulari, acidi sialici, per i quali si instaurerebbe una competizione per il legame e quindi una minore possibilità di iniziare il ciclo replicativo per l'agente infettante secondario.

Un'ulteriore speculazione possibile resta quella di imputare lo svantaggio replicativo del virus NDV ad una ridotta disponibilità di strutture cellulari per la produzione di RNA e proteine, data la pre-esistente replicazione del virus H9N2 a livello degli stessi tessuti target.

Il secondo studio ha dimostrato che in presenza di un buon titolo anticorpale, l'infezione del virus H9N2, pur inducendo uno stato patologico clinicamente evidente, non ha la capacità di compromettere la protezione vaccinale contro un virus vNDV.

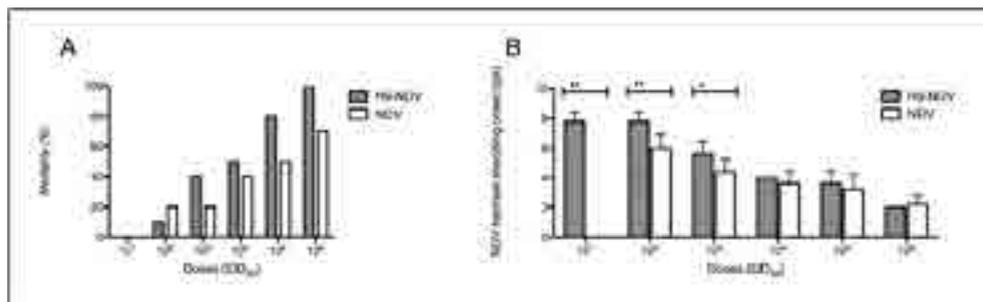
Questi dati, seppure ottenuti in condizioni di laboratorio, confermano che lo schema vaccinale adottato in campo in Israele per prevenire la malattia di Newcastle è efficace,

sia in termini di immunogenicità dei vaccini, sia in termini di identità antigenica tra ceppo vaccinale e virus vNDV circolanti. Resta da capire se in condizioni di campo, la presenza di agenti stressanti ed immunosoppressori, congiuntamente all'infezione da H9N2 possa favorire delle condizioni in grado di indebolire lo stato immunitario degli animali al punto da rompere la protezione contro vNDV.

La replicazione del virus H9N2 a livello dell'ovidotto fino a 5 e 7 giorni p.i. ha compromesso la funzionalità dell'organo traducendosi in un calo dell'ovodeposizione ed un assottigliamento dei gusci durante un periodo di tre settimane, confermando in parte quanto osservato da Qi et al, (Qi et al., 2016). Ulteriori studi permetteranno di valutare la durata del danno funzionale in modo da chiarire se la circolazione di questo virus in un allevamento di galline ovaiole possa tradursi in un calo produttivo permanente.

Gli studi di immunologia condotti sui surnatanti di espunti di ovidotto hanno rilevato pattern di produzione anticorpale contro il virus NDV molto differenti tra i due gruppi, nonostante la replicazione del virus e la sierologia non abbiano dato riscontro di infezione in nessuno dei gruppi. Il calo brusco delle IgG anti-NDV nei soggetti infetti con H9N2, a 10 giorni p.i. potrebbe dipendere da uno stato di fibrosi del tessuto in coltura o da un effetto immunosoppressivo del virus sul tessuto linfatico locale. Approfondimenti di tipo istologico potranno verificare le suddette ipotesi.

I virus H9N2 non sono oggetto di campagne vaccinali in larga parte delle regioni in cui sono endemici e, non essendo virus del sottotipo H5/H7, non comportano misure di controllo specifiche per l'eradicazione della malattia. I dati riportati in questo lavoro confermano la necessità di contenere la circolazione dei virus H9N2, al fine di prevenire cali significativi dell'ovodeposizione.



**Fig.1** A) Mortalità degli animali infettati H9-NDV e NDV; B) Media e  $\pm$  deviazione standard dell'inizio dell'eliminazione virale tracheale degli animali infettati H9-NDV e NDV in giorni post-infezione (dpi= day post infection). \*\*= $P < 0.001$ ; \*= $P < 0.01$ ;

Gruppo	H9-NDV			
	Giorni	3p.i.	5p.i.	7p.i.
TT		9/9	9/9	5/5
TC		5/9	7/9	3/5

**Tab.1** Positività al gene M nella rRT-PCR dei tamponi tracheali e cloacali (TT e TC) dei gruppi di animali coinfectati H9-NDV a 3, 5 e 7 giorni post-infezione H9N2.

## BIBLIOGRAFIA

- Banet-Noach, C., Perk, S., Simanov, L., Grebenyuk, N., Rozenblut, E., Pokamunski, S., Pirak, M., Tendler, Y., Panshin, a, 2007. H9N2 influenza viruses from Israeli poultry: a five-year outbreak. *Avian Dis.* 51, 290–6.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Miller, P.J., Shepherd, E., DeJesus, E., Smith, D.M., Pantin-Jackwood, M.J., 2015. Effect of infection with a mesogenic strain of Newcastle Disease Virus on infection with Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in chickens.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Miller, P.J., Spackman, E., Kapczynski, D.R., Swayne, D.E., Shepherd, E., Smith, D., Zsak, A., Pantin-Jackwood, M., 2014. Virus interference between H7N2 low pathogenic avian influenza virus and lentogenic Newcastle disease virus in experimental co-infections in chickens and turkeys. *Vet. Res.* 45, 1. doi:10.1186/1297-9716-45-1
- Edition, S., 2008. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES ( mammals , birds and bees ) Sixth Edition.
- Ge, S., Zheng, D., Zhao, Y., Liu, H., Liu, W., Sun, Q., Li, J., Yu, S., Zuo, Y., Han, X., Li, L., Lv, Y., Wang, Y., Liu, X., Wang, Z., 2012. Evaluating viral interference between Influenza virus and Newcastle disease virus using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in chicken eggs. *Virology* 453, 128. doi:10.1016/j.virol.2012.05.012
- Qi, X., Tan, D., Wu, C., Tang, C., Li, T., Han, X., Wang, J., Liu, C., Li, R., Wang, J., 2016. Deterioration of eggshell quality in laying hens experimentally infected with H9N2 avian influenza virus. *Vet. Res.* 47, 35. doi:10.1186/s13567-016-0322-4
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L., 2002. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutini. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256–3260. doi:10.1128/JCM.40.9.3256

## LA NUOVA FILIERA UCCELLI ORNAMENTALI: NUOVE OPPORTUNITÀ PER IL MEDICO VETERINARIO

Catania S.<sup>1</sup>, Nardini G.<sup>2</sup>, Grilli G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTI - Laboratorio di Medicina Aviaria, Viale dell'Università, 10, 35020, Legnaro, Padova (PD)

<sup>2</sup>Clinica Veterinaria MODENA SUD, Piazza dei Tintori, 1 – 41057, Spilamberto (MO)

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET), Università degli Studi di Milano - Via Celoria 10, 20133, Italia

Con uccello ornamentale o volatile ornamentale si intende, solitamente nel parlato comune, un animale appartenente alla classe *Aves* che viene allevato o detenuto per scopi ludici-ricreativi, di diletto, per la partecipazione a mostre o eventi del settore. In tale immensa categoria rientrano i *Pet Birds*, ma anche tutti quegli uccelli che allevatori molto specializzati ed appassionati detengono ed allevano per i più disparati fini e che hanno in comune la bellezza o rarità delle specie in oggetto, incluse le specie che solitamente vengono allevate nei giardini zoologici. Occorre segnalare che a seguito delle recenti evoluzioni del rapporto uomo animale non è raro che la specie avicola considerata per eccellenza come animale da reddito e quindi il *Galus gallus* possa essere in alcuni casi e per specifiche condizioni, considerata una specie ornamentale o addirittura un *pet bird*. In pratica con la dizione di uccello ornamentale non si fa altro che indicare lo scopo di utilizzo o di detenzione di tale volatile. Per esempio il pavone può essere considerato “culturalmente” come specie ornamentale anche se tale classificazione non è accettata dalla totalità delle persone, infatti tutt’oggi è considerato da alcuni un volatile che ben si presta alle arti culinarie. Quindi in assoluto non è possibile considerare/classificare una specie come ornamentale o non ornamentale.

E’ interessante sottolineare che nell’ampia categoria di volatili “ornamentali” possono essere rilevate alcune differenze inerenti al rapporto uomo-animale interessanti dal punto di vista sanitario. A tal fine risulta utile suddividere ulteriormente i detentori di uccelli ornamentali in due grandi categorie: gli allevatori veri e propri, che allevando per passione un numero di coppie superiori a 10 impegnano la maggior parte del loro tempo al mantenimento ed alla gestione dell’allevamento con uno scarso contatto fisico con il volatile; ed una ulteriore e più recente categoria, in notevole aumento numerico negli ultimi anni, rappresentata da proprietari che considerano il volatile ornamentale come un “*Pet Animal*”, a cui dedicano di conseguenza una sempre maggiore quantità di tempo a favore di un contatto diretto con l’animale.

Una volta fatta questa doverosa premessa risulta opportuno, a nostro modo di vedere, cercare di capire come la professione Medico Veterinaria si sia evoluta in funzione di tali nuove specie. Infatti secondo la formazione di ognuno di noi l’approccio Medico Veterinario alla medesima problematica in una determinata specie potrebbe essere differente a seconda della considerazione della specie stessa, come specie a carattere produttivo o specie di interesse ornamentale. In particolare l’approccio alle specie ornamentali è, nella maggior parte dei casi, ascrivibile ad un approccio di medicina conservativa mentre nel caso di animali a fini produttivi l’approccio tipico risulta es-

sere quello della medicina di popolazione. E' interessante notare che a seconda della formazione teorico/pratica del professionista una delle due anime (conservativa e di popolazione) può talvolta prendere il sopravvento, determinando in alcuni casi approcci di tipo differente. Tale dicotomia di approccio è molto evidente in medicina aviaria, dove nella immensa vastità della classe *Aves* convivono storiche specie considerate di interesse zootecnico, che peraltro hanno permesso la nascita e lo sviluppo delle scienze veterinarie applicate alle specie aviari, con specie di recente interesse "ornamentale" in cui solitamente nelle prime fasi di approccio sono state applicate le evidenze consolidate della patologia del pollo. Un classico esempio di ciò può essere rappresentato da alcuni testi piuttosto datati che gestivano la coccidiosi "cecale" del canarino come quella del pollo, anche se il canarino non presenta uno sviluppo dei ciechi tale da poter avere uno studio comparato della patologia.

Questa sostanziale ed interessante dicotomia di rapporto o considerazione dell'animale stesso, che correttamente deve essere applicato in funzione dello scopo di utilizzo dell'animale non deve determinare un differente approccio medico alla problematica, ma bensì dovrà essere il Medico Veterinario ad approcciare la problematica in modalità del tutto differente a seconda della classificazione dell'animale o per meglio dire a seconda della contestualizzazione dell'animale stesso.

La medicina veterinaria, infatti, negli ultimi anni ha avuto diversi e differenti sviluppi, basti pensare all'evoluzione tecnologica e genetica degli allevamenti industriali, con conseguente variazione delle manifestazioni patologiche o comparsa di nuove forme cliniche. Inoltre non bisogna dimenticare l'odierna semplicità degli scambi internazionali; l'abbattimento delle distanze si è tramutato, inesorabilmente, in uno scambio di agenti patogeni o parassitari con tempistiche molto ridotte. Queste nuove problematiche sono state individuate e caratterizzate dalla medicina veterinaria che da medicina di gruppo, si è gradualmente trasformata in medicina di filiera ed in seguito in medicina di compartimento, per poi arrivare alla medicina degli ecosistemi. Quindi la visione medico veterinaria deve astrarsi dal singolo fino a contestualizzare lo stesso all'interno del sistema in cui il volatile si trova.

Tale preambolo è stato necessario proprio per introdurre l'importante ruolo che il Medico Veterinario degli uccelli "ornamentali" può svolgere all'interno del Sistema Sanitario Nazionale, sulla base della considerazione del fatto che tali specie aviarie sono sempre più presenti nelle case degli italiani e quindi conseguentemente sempre maggiori sono e saranno i contatti con l'uomo.

Attualmente il mercato dei volatili ornamentali ha subito notevoli mutamenti dovuti principalmente alla maggiore disponibilità di trasporti ed anche allo sviluppo e diffusione di centri specializzati nella vendita di *Pet Animal*, che man mano hanno sostituito o soppiantato le vecchie uccellerie disseminate nel territorio. Tale mutamento ha principalmente modificato: la presentazione dei volatili che risulta essere sicuramente più gradevole anche ai non addetti del settore, l'areale di competenza che si dimostra essere notevolmente ampliato, ma di contro ha determinato in alcuni casi un impoverimento tecnico/gestionale dei conduttori che risultano essere degli impiegati formati ad espletare determinate azioni e non più appassionati che gestivano una piccola rivendita. Infine in tali aree commerciali gli uccelli sono solitamente mantenuti insieme ad altri animali quali rettili, roditori ecc., incrementando il rischio di trasmissione, amplificazione e diffusione di alcune classiche patologie.

Quindi tale nuova organizzazione può determinare, inesorabilmente, una maggiore

variabilità di problematiche dovute principalmente alla formazione di gruppi di provenienza varia, gestiti alle volte da personale non particolarmente attento o preparato a queste evenienze.

Tali aspetti sono di particolare rilevanza per la nuova figura del Medico Veterinario di volatili ornamentali in cui le differenti anime, medicina conservativa e medicina di popolazione, devono essere opportunamente bilanciate per gestire e governare al meglio tale importante cambiamento che coinvolge numerose famiglie italiane. Quindi il Medico Veterinario durante la classica “prima visita” di controllo oltre a stabilizzare il paziente in caso di alterazioni clinico-patologiche, deve formare il proprietario sulle possibili ed eventuali problematiche correlate al volatile stesso in modalità precisa e puntuale in modo da evitare inutili allarmismi, che rappresentano uno dei risvolti negativi dell’informazione sanitaria, in particolare con conduttori/proprietari piuttosto apprensivi.

Fortunatamente, nell’ambito delle comuni specie di uccelli ornamentali, la trasmissione di malattia all’uomo risulta essere un evento piuttosto raro, anche se occorre sempre ricordare che in particolari condizioni, quali ceppi particolarmente patogeni, uno stretto rapporto uomo-animale, scorrette attività di gestione degli animali, malattie o trattamenti immunodepressivi del conduttore/proprietario possono incrementare il rischio di trasmissione del patogeno.

In conclusione il Medico Veterinario specialista in volatili ornamentali o “*pet birds*” deve sicuramente risolvere i problemi sanitari del singolo soggetto, contestualizzarli all’interno dell’eventuale gruppo di provenienza o arrivo, valutare all’interno del sistema “Ornamentali” quali potrebbero essere le problematiche più frequenti e infine mettere il proprietario/conduttore nelle condizioni di operare al massimo per la sicurezza del singolo soggetto, del gruppo di volatili ed in particolare per la salute stessa del conduttore. Quindi rispetto alla classica visione dicotomica del Medico Veterinario che si occupa di volatili zootecnici o di volatili ornamentali sempre più si rende necessaria la formazione o la presenza nel nostro contesto sanitario di una figura professionale che abbia specifiche conoscenze riguardanti le specie ornamentali e le patologie che possono manifestarsi in queste ultime, al fine di gestire dal punto di vista sanitario questa nuova filiera creando le corrette condizioni per evitare la diffusione delle malattie infettive, e quindi conseguentemente ridurre il rischio di trasmissione all’uomo, inoltre tale figura professionale sarà deputata anche alla corretta formazione del proprietario/detentore ed in particolare nei nuovi “*pet store*” dove la carenza di tale figura professionale risulta evidente con conseguenti rischi di tipo sanitario.

## **BOTULISMO INDOTTO DA TOSSINA MOSAICO C/D IN UN'AREA NATURALE PROTETTA**

Circella E.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>2</sup>, Greco G.<sup>1</sup>, Marino M.<sup>1</sup>, Cocciolo G.<sup>1</sup>, D'Onghia F.<sup>1</sup>, Marzano G.<sup>3</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", S. P. per Casamassima km. 3, 70010, Valenzano, Bari, Italia*

<sup>2</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Treviso, Italia;*

<sup>3</sup>*Riserva naturale "Torre Guaceto", Carovigno BR, Italia*

### **Summary**

Botulism is a paralytic disease caused by botulinum neurotoxins (BoNTs). BoNTs type C and D are responsible for the most cases of avian botulism. This is the first report concerning a large avian botulism outbreak due to the exposure to BoNTs type C/D, occurred in a wildlife sanctuary in Southern Italy.

### **INTRODUZIONE**

Il botulismo è una grave patologia caratterizzata da paralisi fraccida causata dall'assunzione di neurossine botuliniche (BoNTs) prodotte da germi anaerobi, sporigeni, Gram-positivi appartenenti al genere *Clostridium*. BoNTs sono classificate in 7 diversi sierotipi, A, B, C, D, E, F. Tra questi, i tipi C e D sono riconosciuti come più frequenti responsabili della maggior parte dei casi di botulismo aviare.

Nei volatili selvatici la patologia è stata descritta fin dal 1920 negli Stati Uniti, laddove è ancora molto presente, e successivamente in Australia nel 1931 (Pullar, 1934), in Sud America nel 1947 (Szyfres et al., 1948) ed in Giappone nel 1963 in uccelli acquatici. Rispetto al panorama mondiale, in Europa le segnalazioni di botulismo nei selvatici sono relativamente recenti. Nell'avifauna selvatica vennero descritti focolai in Danimarca nel 1967, e successivamente in Inghilterra nel 1969 ed in Svezia nel 1975. Ulteriori focolai sono stati riportati in Danimarca, in Norvegia, in Olanda, in Ungheria, in Repubblica Ceca, in Serbia, in Slovenia, in Francia, in Germania, in Irlanda, nel Regno Unito ed in Spagna (Neimanis and Speck, 2012). In tutti i casi descritti, il tossinotipo responsabile è risultato il tipo C, portando a ritenere il botulismo di tipo C quello più diffuso dal punto di vista epidemiologico in Europa.

In Italia, i dati sono piuttosto scarsi e frammentari, con una segnalazione nel 2001 ed una più recente nel 2011 (De Filippo et al., 2013), e la descrizione di focolai verificatisi rispettivamente in Lombardia ed in Emilia Romagna. Anche in questi casi, la tossina responsabile della patologia è stata classificata come tossina di tipo C.

Recentemente, sono stati riportati alcuni casi di botulismo in volatili acquatici in Europa ed in Giappone, causati da una tossina mosaico delle tossine C e D (Woudstra et al., 2012).

Lo scopo di questo lavoro è quello di riportare un caso di botulismo indotto da una tossina mosaico di tipo C/D, osservato per la prima volta in Italia e caratterizzato da mortalità di volatili selvatici in una oasi naturale protetta.

## MATERIALI E METODI

### *Breve descrizione del caso e dell'oasi naturale in cui si è verificato il focolaio*

Il caso di botulismo è stato osservato a Torre Guaceto (40°42'54.69"N, 17°47'59.58"E), un'oasi naturale protetta inclusa dal 2008 tra le *Specially Protected Areas of Mediterranean Importance (SPAMI)*. L'oasi si trova a Carovigno in provincia di Brindisi e si estende su 1500 ettari, con un'area umida di dimensioni pari a 200 ettari. Nell'oasi sono presenti più di 180 differenti specie di volatili selvatici, la maggior parte delle quali rappresentate da specie di uccelli migratori. Nell'area umida, alcuni mesi prima della comparsa del focolaio, era stata allestita una vasca artificiale in cui erano stati posti dei cefali (*Mugil cephalus*) al fine di fornire una ulteriore fonte di approvvigionamento alimentare per i volatili ospitati nell'oasi.

Il numero di pesci all'interno della vasca artificiale è tuttavia, col tempo, aumentato esponenzialmente con conseguente comparsa di mortalità che ha raggiunto il picco verso fine estate, tra la fine di agosto e gli inizi del mese di settembre, quando le temperature ambientali mediamente erano pari o superiori a 30 °C. In questo stesso periodo, è stata osservata la comparsa di mortalità tra i volatili. In particolare, sono stati ritrovati deceduti: 7 germani reali (*Anas platyrhynchos*), 4 alzavole (*Anas teal*), 1 marzaiola (*Anas querquedula*), 2 piro piro boscherecci (*Tringa glareola*), 1 garzetta (*Egretta garzetta*), 1 tuffetto (*Tachybaptus ruficollis*) e 4 folaghe (*Fulica atra*). Vista la vastità dell'area naturale, non si può escludere che non vi siano stati altri soggetti deceduti che non sono stati individuati. Inoltre sono stati rinvenuti frammenti di ali e parti di carcasse di animali, molto probabilmente predati in seguito al decesso. Un germano reale ed un piro piro boschereccio sono stati ritrovati ancora vivi ma sono deceduti dopo poche ore dal ritrovamento. Prima del decesso, gli animali apparivano incapaci di volare ed in preda a paralisi flaccida del collo e delle ali, che ricadevano a peso morto se sollevate manualmente.

Due germani reali, 2 piro piro boschereccio, una garzetta ed un tuffetto sono pervenuti presso la sezione di Patologia Aviaria del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari per l'esecuzione di accertamenti diagnostici. Tuttavia, tali accertamenti sono stati effettuati dai due germani reali, uno dei quali era stato rinvenuto ancora vivo, ed uno dei due piro piro boscherecci, in quanto i restanti soggetti sono stati scartati per la presenza di eccessivi fenomeni di decomposizione e degradazione delle carcasse.

### *Indagini di laboratorio*

Campioni di tessuto (fegato, intestino, cervello e coagulo ematico dalle cavità cardiache) sono stati raccolti, in sede autoptica, per gli accertamenti diagnostici. Poiché i dati anamnestici, i segni clinici osservati nei due volatili ritrovati ancora vivi, ed il quadro anatomo-patologico hanno indotto ad ipotizzare un focolaio di botulismo, le analisi sono state orientate alla ricerca di *Clostridium botulinum* e delle tossine. Inoltre, come possibili responsabili di sintomatologia nervosa nei volatili, sono stati ricercati anche gli agenti responsabili della Malattia di Newcastle e dell'Influenza aviaria.

Per la ricerca di *C. botulinum* e delle tossine botuliniche, i campioni di fegato ed intestino sono stati seminati in un brodo di arricchimento (Fortified Cooked Meat Medium - FCMM) (Kurazono et al., 1985), nel rapporto di 1:10 e sottoposti a trattamento termico a 71 °C per 10 minuti. Successivamente, i brodi sono stati incubati a 37 °C in condizioni di anaerobiosi con il 5% di idrogeno, il 5% di biossido di carbonio e il 90% di nitrogeno (Bactron IV anaerobic chamber - Shel Lab, Cornelius, OR, USA). Dopo 48 ore di incubazione, sono stati prelevati 175 µl di dal fondo di ogni brodocoltura e sottoposti ad estrazione del DNA mediante MagMax Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion/Life Technologies, Carsland, CA, USA) e PCR per la ricerca di geni di *C. botulinum* codificanti per le neurotossine A, B, C, D, E, F secondo un protocollo precedentemente descritto (De Medici et al., 2009). Le brodoculture corrispondenti ai campioni risultati positivi sono state ripassate sul terreno di coltura Egg Yolk Agar (EYA), prodotto aggiungendo al Blood Agar Base N°2 (Oxoid) (BaB2) 50 ml/l di yolk solution, ottenuto a sua volta miscelando sterilmente 25 ml di tuorlo di uovo con 25 ml di soluzione fisiologica. I campioni sono stati incubati a 37 °C nelle stesse condizioni di anaerobiosi precedentemente descritte. Dopo 48 ore di incubazione le colonie sospette, di piccole dimensioni, lecitinasi positive, lipasi positive e debolmente emolitiche, sono state raccolte e trasferite in 10 ml di brodo FCMM, incubate a 37 °C per 48 ore e sottoposte a PCR per i tossinotipi A, B, C, D, E, F come già descritto. La ricerca dei tossinotipi mosaico C-D e D-C è stata effettuata mediante Macroarray secondo protocolli descritti da Woudstra et al. (2012).

La prova biologica per la ricerca della neurotossina (Mouse Lethality Assay - MLA) (CDC, 1998), è stata effettuata dai sieri ottenuti (0,4 ml e 0,2 ml) dai coaguli prelevati dalle cavità cardiache dei due germani reali, mentre il campione prelevato dal piro piro è risultato insufficiente per poter eseguire il test. La prova biologica è stata inoltre effettuata anche dai surnatanti delle brodoculture ottenute dalle colonie sospette e risultate positive in PCR, filtrate con carta da filtro (0,45 mm) (Millipore, Tullagreen, Ireland).

I virus della Malattia di Newcastle e dell'Influenza aviaria sono stati ricercati, a partire dai campioni di cervello, mediante Multiplex - PCR con protocolli già descritti in bibliografia (Pang et al., 2002).

Sono stati infine allestiti, dai campioni di fegato e sangue del cuore, esami batteriologici *di routine* su terreni selettivi (MacConkey Agar, Oxoid) e arricchiti (TSA, Oxoid), incubati in aerobiosi a 37 °C per 24 ore.

## **RISULTATI**

All'esame autoptico, non venivano rilevate particolari lesioni macroscopiche, ad eccezione di fenomeni congestizi generalizzati (Foto 1). Il tratto gastroenterico risultava praticamente vuoto nei due germani reali, mentre erano presenti solo piccole quantità di materiale alimentare nello stomaco del piro piro.



**Foto 1:** Congestione a carico dei reni

Inoltre, nel germano reale rinvenuto già deceduto, si evidenziava anche un ispessimento del sacco aereo toracico sinistro con presenza di qualche lacinia fibrinosa (Foto 2).



**Foto 2:** Congestione polmonare e presenza di essudato fibrinoso

### ***Esami di laboratorio***

La ricerca dei virus della Malattia di Newcastle e dell'Influenza aviaria dai campioni di cervello ha dato esito negativo. Le indagini batteriologiche di *routine* hanno portato all'isolamento di *Escherichia coli* dal sacco aereo toracico sinistro del germano reale in cui era stato rilevato in quella sede, durante l'autopsia, il deposito di fibrina.

I brodi di arricchimento inoculati con i campioni di fegato ed intestino sono risultati positivi per *C. botulinum* di tipo C mediante PCR. Le indagini svolte mediante Macroarray hanno consentito di caratterizzare la tossina come mosaico di tipo C/D.

La prova biologica è risultata positiva per il siero di germano reale utilizzato in quantitativo maggiore (0,4 ml), che è stato neutralizzato dall'antitossina C, mentre è risultata negativa per il secondo siero, in quantitativi pari a 0,2 ml. Analogamente, le prove effettuate dai surnatanti delle colonie sospette hanno permesso di individuare la tossina C.

## DISCUSSIONE

Il focolaio di botulismo osservato nell'oasi di Torre Guaceto è stato causato dalla tossina mosaico C/D. Nei volatili selvatici, il tipo C è il botulismo principalmente riscontrato così come riportato nella maggior parte delle segnalazioni scientifiche (Defilippo et al., 2013; Neimanis and Speck, 2012). Recentemente, il ricorso a metodiche più sensibili rispetto a quelle spesso utilizzate ha tuttavia permesso di evidenziare la diffusione del tossinotipo C/D nell'avifauna europea (Vidal et al. 2013; Woudstra et al. 2012).

Nel corso delle indagini svolte nel caso del focolaio descritto, la tossina individuata è risultata inizialmente, sia in PCR che nel corso delle prove biologiche, una tossina di tipo C. Successivamente, l'analisi in Macroarray ha permesso di classificare più correttamente la tossina come tossinotipo C/D. Questo evidenzia l'importanza di individuare ed utilizzare metodiche sempre più accurate e sensibili, in modo da arrivare ad una più corretta classificazione dei germi e delle tossine responsabili dei casi di patologia osservati. Sia la prova biologica che la maggior parte dei protocolli di PCR descritti in letteratura non discriminano tra la tossina C e la tossina mosaico C/D (Woudstra et al. 2012). Non è da escludere che la negatività del siero di uno dei due germani reali evidenziata nel corso della prova biologica sia stata legata allo scarso quantitativo del siero stesso, e quindi della tossina. Infatti, MLA è un test che non è molto sensibile a bassi quantitativi di tossina (Le Maréchal et al. 2016).

Diversi fattori possono aver portato nell'area naturale ad un incremento ambientale della tossina. Le temperature medie in concomitanza con l'insorgenza del focolaio si aggiravano intorno ai 30 °C, temperatura ottimale per la replicazione di *C. botulinum* e per la produzione della tossina (Rocke and Bollinger, 2007). Questo è uno dei motivi per cui si osserva un incremento dei casi di botulismo nel periodo estivo ed all'inizio dell'autunno (Woo et al., 2010).

Considerando che la presenza di materiale organico facilita la produzione della tossina C/D (Anza et al. 2014), la moria di pesci avvenuta nella vasca artificiale potrebbe aver giocato un importante ruolo, incrementando nell'ambiente la quantità di materiale in decomposizione. Inoltre, sebbene i pesci deceduti non siano stati analizzati ed i pesci siano generalmente ritenuti reservoir della tossina botulinica di tipo E (Rocke and Bollinger, 2007), non si può escludere che abbiano avuto anche un ruolo diretto nel caso di botulismo descritto, considerando che è stato evidenziato che alcuni pesci, come la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), possono essere fonte di tossina C per i pellicani (Nol et al. 2004), e che sono stati riportati casi di botulismo di tipo C che hanno coinvolto numerosi pellicani, aironi ed altri volatili ittivorici (Rocke et al., 2004; Neimanis et al., 2007). Le larve di ditteri sono considerate, dal punto di vista epidemiologico, importanti nel botulismo dei selvatici in quanto fungono da concentratori di tossina e possono veicolarla ai volatili che le assumono cibandosene (Rocke and Bollinger, 2007). Tuttavia, nel caso descritto, non sono state riscontrate nel tratto gastroenterico di nessuno dei volatili esaminati e pertanto si ritiene che non abbiano avuto un ruolo importante.

## CONCLUSIONI

Il caso descritto rappresenta la prima descrizione in Italia di un focolaio di botulismo osservato nell'avifauna selvatica indotto dalla tossina mosaico C/D. Considerando che recentemente è stata evidenziata la presenza di *C. botulinum* di tipo C/D in campioni fecali di volatili acquatici (Anza et al. 2016), le specie migratrici possono aver contribuito a disseminare il germe nell'oasi, con l'insorgenza del focolaio quando sono subentrate le condizioni ambientali ottimali per il batterio e per la produzione della tossina.

## BIBLIOGRAFIA

**Anza I, Vidal D, Feliu J, Crespo E, Mateo R.** (2016). Differences in the Vulnerability of Waterbird Species to Botulism Outbreaks in Mediterranean Wetlands: an Assessment of Ecological and Physiological Factors. *Appl Environ Microbiol* 82:3092-3099.

**Anza I, Vidal D, Laguna C, Díaz-Sánchez S, Sánchez S, Chicote Á, Florín M, Mateo R.** (2014). Eutrophication and Bacterial Pathogens as Risk Factors for Avian Botulism Outbreaks in Wetlands Receiving Effluents from Urban Wastewater Treatment Plants. *Appl Environ Microbiol* 80:4251–4259.

**Centers for Disease Control and Prevention.** (1998). Botulism in the United States, 1899–1996. In: *Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers*. US Department of Health and Human Service, Atlanta, GA, CDC; pp. 1-42.

**De Medici D, Anniballi F, Wyatt GM, Lindstrom M, Messelhoefer U, Aldus CF, Delibato E, Korkeala H, Peck MW, Fenicia L.** (2009). Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 75:6457-6461.

**Defilippo F, Luppi A, Maioli G, Marzi D, Fontana MC, Paoli F, Bonilauri P, Dottori M, Merialdi G.** (2013). Outbreak of type C botulism in birds and mammals in the Emilia Romagna region, Northern Italy. *J Wildl Dis* 49: 1042–1046.

**Le-Maréchal CL, Ballan V, Rouxel S, Bayon-Auboyer MH, Baudouard MA, Morvan H, Houard E, Požvevara T, Souillard R, Woudstra C, Le Bouquin S, Fach P, Chemaly M.** (2016). Livers provide a reliable matrix for real-time PCR confirmation of avian botulism. *Anaerobe* 38: 7-13.

**Neimanis A, Gavier-Widén D, Leighton F, Bollinger T, Rocke T, Mörner T.** (2007). An outbreak of type C botulism in herring gulls (*Larus argentatus*) in Southeastern Sweden. *J Wildl Dis* 43:327-336.

**Neimanis A, Speck S.** (2012). Clostridium species and botulism. In: *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Gavier-Widén D, Duff JP, Meredith A, editors. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK, pp. 417-427.

**Nol P, Roche TE, Gross K, Yuill TM.** (2004). Prevalence of neurotoxic *Clostridium botulinum* type C in the gastrointestinal tracts of Tilapia (*Oreochromis Mossambicus*) in the Salton sea. *J Wildl Dis* 40:414-419.

**Pang Y, Wang H, Girshick T, Xie Z, Khan MI.** (2002). Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Dis* 46:691-699.

**Pullar E.M.** (1974). Enzootic botulism amongst wild birds. *Aust Vet J*; 10 (4): 128-35

**Roche TE, Bollinger TK.** (2007). Avian botulism. In: *Infectious diseases of wild birds*, Thomas T, Hunter DB, Atkinson CT, editors. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 377-416.

**Roche TE, Nol P, Pelliza C, Sturm K.** (2004). Type C botulism in pelicans and other fish-eating birds at the Salton Sea. *Stud Avian Biol* 27:136-140.

**Szyfres B., Trechi H., Abaracon D.** 1948. Entoxicacion botulinica en patos. *Rev Med Vet* (Montevideo, Uruguay) 6: 818-24.

**Vidal D, Anza I, Taggart MA, Pérez-Ramírez E, Crespo E, Hofle U, Mateo R.** (2013). Environmental Factors Influencing the Prevalence of a *Clostridium botulinum* Type C/D Mosaic Strain in Nonpermanent Mediterranean Wetlands. *Appl Environ Microbiol* 79: 4264–4271.

**Woo G, Kim H, Bae Y, Jean YH, Yoon Y, Bak E, Hwang E, Joo Y.** (2010). Outbreak of botulism (*Clostridium botulinum* type C) in wild waterfowl: Seoul, Korea. *J Wildl Dis* 46:951-955.

**Woudstra C, Skarin H, Anniballi F, Fenicia L, Bano L, Drigo I, Koene M, Bâyon-Auboyer MH, Buffereau JP, De Medici D, Fach P.** (2012). Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78:3120–3127.

## INDAGINE MICROBIOLOGICA SU BORRE DI RAPACI

Dipineto L.<sup>1</sup>, Pace A.<sup>1</sup>, De Luca Bossa L.M.<sup>2</sup>, Russo T.P.<sup>1</sup>, Varriale L.<sup>1</sup>, Gargiulo A.<sup>2</sup>, Borrelli L.<sup>1</sup>, Raia P.<sup>2</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>

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

### Summary

Seventy birds of prey pellets belonging to different species and housed at the Wildlife Rescue and Rehabilitation Center of Napoli were collected and microbiologically analyzed by culture and biochemical methods as well as by serotyping and polymerase chain reaction. Pellets examined contained a wide range of microorganism, some of them potentially zoonotic (i.e. *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* O serogroups). This study confirms the role of birds of prey as a potential asymptomatic carrier of pathogenic bacteria which could be disseminated in the environment not only through the birds of prey feces but also through their pellets.

### INTRODUZIONE

La borra è un rigurgito, contenente residui alimentari non digeriti, prodotto da diversi uccelli; è importante per favorire l'espulsione dei resti indigesti di cibo rappresentati, nei rapaci, soprattutto da penne, ossa e pelliccia della preda (Taberlet & Fumagalli, 1996). Le borre, inoltre, potrebbero veicolare agenti patogeni quali virus e batteri rappresentando così un rischio per la salute animale e umana. A tal riguardo, infatti, sono stati segnalati focolai di salmonellosi in due scuole elementari negli USA associate alla dissezione di borre di rapaci (Smith *et al.*, 2005). Il presente studio, pertanto, è stato condotto con lo scopo di effettuare un'indagine microbiologica su borre di rapaci con particolare riferimento a batteri con carattere zoonotico.

### MATERIALI E METODI

#### Campionamento

Nel corso degli anni 2012/2014 sono stati esaminati 70 rapaci appartenenti a differenti specie e ospitati presso il Centro di Recupero Animali Selvatici (CRAS) di Napoli. In particolare, i rapaci erano rappresentati da Gheppio comune (*Falco tinnunculus*; n=25), Falco pellegrino (*Falco peregrinus*; n=13), Poiana (*Buteo buteo*; n=12), Sparviere (*Accipiter nisus*; n=6), Barbagianni (*Tyto alba*; n=5), Allocco (*Strix aluco*; n=4), Gufo reale (*Bubo bubo*; n=2), Gufo di palude (*Asio flammeus*; n=2), Biancone (*Circaetus gallicus*; n=1). Ciascun volatile veniva temporaneamente posto in una scatola dalla quale, al momento del rigurgito, veniva prelevata la borra mediante l'ausilio di un telo chirurgico sterile posizionato sul fondo. Il campionamento avveniva, per la maggior parte dei rapaci, il giorno del ricovero e prima della somministrazione di eventuali farmaci. Ciascuna borra veniva pesata e suddivisa in 5 parti uguali.

### Isolamento e identificazione

Le sezioni di borre venivano inoculate in buffered peptone water (BPW), *Campylobacter*-selective enrichment broth (CSEB), cooked meat medium (CMM), modified tryptone soya broth (MTSB), phosphate buffered saline (PBS). I campioni inoculati in BPW venivano incubati a 37 °C per 24 ore e poi seminati in Rappaport-Vassiliadis broth (RV) nonché su Columbia blood agar base (CBA; Oxoid), *Pseudomonas* cetrinide agar (PCA; Oxoid), MacConkey agar (MCA; Oxoid) e Baird-Parker agar (BPA; Oxoid). I campioni inoculati in MTSB venivano incubati a 37 °C per 24 ore e poi seminati su sorbitol MacConkey agar (SMCA; Oxoid). I campioni inoculati in CSEB venivano incubati in atmosfera microaerofila a 42 °C per 48 ore e poi seminati su *Campylobacter* blood-free selective agar (CBFA; Oxoid). I campioni inoculati in CMM venivano, invece, incubati in anaerobiosi a 37 °C per 24 ore e poi piastrati su anaerobe basal agar (ABA; Oxoid). I campioni inoculati in PBS erano incubati a 4 °C per 14 giorni e poi seminati su *Yersinia* selective agar base (cefsulodin-irgasan-novobiocin, CIN Agar; Oxoid) e incubati a 30 °C per 24–48 ore. Le piastre di CBA, PCA, MCA, SMCA, CEOA e BPA venivano incubate a 37 °C per 24–48 ore, mentre RV veniva incubato a 42°C per 24–48 ore e poi piastrato su xylose lysine desoxycholate agar (XLD) e brilliant green agar (BGA); le piastre CBFA venivano incubate in microaerofilia a 42 °C per 24-48 ore, mentre le piastre ABA erano incubate in anaerobiosi a 37 °C per 48 ore e valutate giornalmente, per una settimana, prima di eliminarle. Tutti gli isolati venivano preventivamente identificati sulle basi delle loro caratteristiche morfologiche, di esigenze di crescita, colorazione di Gram, test di motilità e produzione di pigmenti, nonché mediante test biochimici e fenotipici convenzionali. Successivamente, gli isolati venivano identificati biochimicamente mediante i sistemi API 20 E, API 20 NE (bioMerieux, Mercy-l'Etoile, France) and RapID ANA II, RapID NF PLUS, RapID STAPH PLUS (Oxoid). I ceppi di *Escherichia coli* venivano sottoposti a sierotipizzazione mediante antisieri poli- e monospecifici (Sifin), mentre *Salmonella* veniva sierotipizzata in collaborazione con il Centro di referenza nazionale e Laboratorio di referenza OIE per le salmonellosi (IZSve, Legnaro, PD). Infine, i ceppi di *Campylobacter* spp. venivano identificati mediante PCR come suggerito da Gargiulo *et al.* (2008).

### RISULTATI

Le borre analizzate presentavano un'ampia varietà di batteri, spesso isolati contemporaneamente dalla stessa borra. Tra i batteri Gram negativi, *E. coli* veniva isolato da 47/70 (67,1%) borre esaminate e sierotipizzato nei sierogruppi O26 ( $n=8$ ), O55 ( $n=2$ ), O103 ( $n=13$ ), O145 ( $n=6$ ), O164 ( $n=4$ ); i rimanenti ceppi venivano identificati come *E. coli* generici. *Salmonella* spp. veniva isolata da 2/70 (2,9%) borre e sierotipizzata come *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Campylobacter* spp. veniva isolato da 25/70 (35,7%) borre e identificato come *C. coli*. Inoltre, venivano isolati *Enterobacter cloacae* (18/70; 25,7%), *c* (19/70; 27,1%), *Citrobacter freundii* (23/70; 32,9%), *C. brakii* (2/70; 2,9%), *C. youngae* (2/70; 2,9%), *Klebsiella pneumoniae* (11/70; 15,7%), *Achromobacter xylosoxidans* (9/70; 12,9%); *Alcaligenes faecalis* (2/73; 2,9%). Non si isolavano, invece, *Pseudomonas* spp. e *Yersinia* spp. Per quel che concerne i batteri Gram positivi, *Staphylococcus* spp. veniva isolato da 61/70 (87,1 %) borre e identificato come *S. aureus* ( $n=26$ ); i rimanenti ceppi venivano identificati come stafilococchi coagulasi-negativi. I

batteri anaerobi venivano ritrovati in basse percentuali. Nello specifico, si isolavano *Fusobacterium necrophorum* (7/70; 10,0%), *Clostridium perfringens* (4/70; 5,7%), *Bacteroides* spp. (3/70; 4,3%).

## DISCUSSIONE

Recentemente, le borre sono state impiegate in vari studi inerenti la biologia, la tafonomia e l'ecologia (Terry, 2004; Scheibler & Christoff, 2007). Tuttavia, studi sulla microbiologia delle borre sono scarsi e concernenti segnalazioni aneddotiche (Smith *et al.*, 2005). Nella presente indagine, i microrganismi maggiormente isolati dalle borre appartenevano alla famiglia delle Enterobacteriaceae, seguiti da *Staphylococcus* spp. e dai batteri anaerobi. In particolare, sono stati identificati dodici generi di batteri, la maggior parte dei quali considerati potenzialmente zoonotici (*i.e.* *S. Typhimurium*, *C. coli*, *E. coli* sierogruppo O) oppure opportunisti (*e.g.* *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. perfringens*) per l'uomo. Un ritrovamento interessante è stato l'isolamento di *S. Typhimurium* che, per quanto riscontrata in basse percentuali (2,9%), conferma le borre come potenziale fonte di infezione per l'uomo come anche dimostrato dallo studio di Smith *et al.* (2005) che riportava epidemie da *Salmonella* spp. in seguito al contatto con borre di rapaci. Non è stato possibile indagare sulle fonti di contaminazione delle borre sebbene l'alimentazione sembri l'ipotesi più plausibile come anche dimostrato da uno studio condotto da Kirkwood *et al.* (1994) in cui, lo stesso fagotipo di *S. Enteritidis*, veniva isolato sia da campioni fecali di rapaci che dai pulcini utilizzati per la loro dieta.

## CONCLUSIONI

In virtù dell'ampia varietà di batteri isolati, pertanto, il presente studio evidenzia il possibile ruolo dei rapaci come carrier asintomatici di batteri potenzialmente patogeni, in grado di diffonderli nell'ambiente non solo attraverso le loro feci ma anche mediante le loro borre.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gargiulo A., Rinaldi L., D'Angelo L., Dipineto L., Borrelli L., Fioretti A., Menna LF. (2008). Survey of *Campylobacter jejuni* in stray cats in southern Italy. *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 267–270
2. Kirkwood JK, Cunningham AA, Macgregor SK, Thornton SM, Duff JP. (1994). *Salmonella enteritidis* excretion by carnivorous animals fed on day-old chicks. *Vet. Rec.* 134: 683
3. Scheibler DR, Christoff AU. (2007). Habitat associations of small mammals in southern Brazil and use of regurgitated pellets of birds of prey for inventorying a local fauna. *Braz. J. Biol.* 67: 619–625
4. Smith KE, Anderson F, Medus C, Leano F, Adams J. (2005). Outbreaks of salmonellosis at elementary schools associated with dissection of owl pellets. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5: 133–136
5. Taberlet P, Fumagalli L. (1996). Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Mol. Ecol.* 5: 301-5.
6. Terry RC. (2004). Owl pellet taphonomy: a preliminary study of the post-regurgitation taphonomic history of pellets in a temperate forest. *Palaios* 19: 497–506

## IMPIEGO DELL'ENDOPEP-MS PER LA DIAGNOSI DEL BOTULISMO AVIARE: RISULTATI PRELIMINARI

Drigo I., Pascoletti S., Tonon E., Puiatti C., Bano L.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di batteriologia speciale SCT2- Treviso. Vicolo Mazzini 4, 31020 Fontane di Villorba (TV)*

### Summary

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are the most poisonous substances known and for this reason, they are considered a possible bioterrorism weapon. Avian botulism is sustained mainly by Type C botulinum neurotoxin (BoNT/C). The reference method for BoNTs detection and identification, both in food and clinical samples, is the mouse bioassay. This method is sensitive, specific and is able to measure also toxin activity but it is time consuming and requires the use of many animals that represent an important ethical issue. Mass spectrometry has become an important analytical tool for many applications in microbiology, including bacteria identification. Recently a method for toxin detection and serotype differentiation based on LC-ESI-MS/MS and MALDI-TOF MS (EndoPep-MS method), coupled with antibody purification and enrichment of toxins, it has been developed and successfully applied on sera and feces for detection of A, B, E and F toxins and promising results were obtained also for toxin C and D.

The specific objective of this work is to set up and validate a mass spectrometry method for detection of BoNT/C in animal origin samples using the MALDI-Biotyper instrument (Bruker Daltonics). The EndoPep-MS showed to be efficiently applicable to MALDI-Biotyper instrument. The sensitivity of the method applied on naturally contaminated samples (sera and faeces) showed a sensitivity higher than the mouse test, considered the gold test for the BoNTs detection. Moreover, the EndoPep-MS allow reducing the time of response, the cost of analysis and, above all, it showed to be a reliable and ethically tenable replacement of the use of animals for the diagnosis of botulism.

### INTRODUZIONE

Le neurotossine botuliniche (BoNT) sono tra le sostanze biologiche più tossiche conosciute e per questo motivo sono anche considerate una possibile arma bioterroristica (1). Le BoNT sono prodotte da alcuni batteri del genere *Clostridium* in particolare *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum* e *C. argentinense* e sono suddivise in sette sierotipi, da A a G, in base alla loro attività antigenica. I casi di botulismo animale sono da ricondurre prevalentemente ai sierotipi C e D o a tossine definite "mosaico" in quanto presentano antigeni riferibili sia al tipo "D" che al tipo "C". Queste ultime forme si definiscono C/D quando i determinanti antigenici del tipo C prevalgono su quelli del tipo D, oppure D/C in caso contrario (5). Attualmente il gold test per la conferma dei casi di botulismo è rappresentato dalla prova biologica su topo: si tratta di un saggio di letalità che risulta essere molto sensibile (LoD stimata per la tossina A pari a 1 mDL<sub>50</sub> topo) ed in grado di valutare contemporaneamente la presenza di tossine biologicamente attive e, mediante l'utilizzo di antisieri specifici, anche di definire il sierotipo della tossina coinvolta. Tuttavia, il *mouse bioassay* richiede il sacrificio di numerosi animali e almeno 4 giorni di tempo per la conferma dei campioni negativi (8). Molti sforzi sono stati fatti negli ultimi anni con l'intento di sviluppare metodi alternativi alla prova di letalità su topo ma con

scarsi risultati. Recentemente un gruppo di ricerca del Centers for Disease and Control di Atlanta (USA) ha messo a punto un metodo basato sulla tecnologia MALDI-TOF per la rilevazione e la differenziazione in sierotipi delle tossine botuliniche più frequentemente coinvolte in episodi di malattia dell'uomo. Questo metodo, denominato Endopep-MS, permette d'individuare la presenza ed il sierotipo di BoNTs attive, attraverso la rilevazione dei prodotti di clivaggio di peptidi sintetici che mimano i naturali substrati di queste tossine ad attività metallo-proteasica. L'EndoPep-MS è stato applicato con successo su campioni di siero e feci per la rilevazione delle tossine A, B, E ed F e promettenti risultati sono stati ottenuti anche con le tossine C e D (2, 3, 6, 7). Lo sviluppo di metodi basati sulla tecnologia MALDI-TOF MS per l'identificazione batterica hanno avuto un rapido sviluppo negli ultimi anni e questa rapida diffusione in un numero crescente di laboratori diagnostici è dovuta alla sua versatilità, rapidità di analisi, alla riduzione dei costi dei materiali di consumo ed alla possibilità di testare un numero elevato di campioni in poco tempo. Il principale obiettivo di questo lavoro è quello di mettere a punto e validare un test Endopep-MS che permetta di rilevare e caratterizzare rapidamente la presenza delle BoNT di tipo C in campioni clinici utilizzando lo strumento MALDI Biotyper (Bruker Daltonics).

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

I campioni biologici sottoposti all'analisi sono stati raccolti nel corso di 11 focolai di botulismo aviario osservati tra il 2009 e il 2015. Questi erano costituiti da 18 sieri (12 polli, 1 tacchino, 2 fagiani, 2 germani reali, 1 anatra domestica) prelevati da soggetti sintomatici, e da un campione di contenuto intestinale di un cigno deceduto dopo una sintomatologia caratterizzata da paralisi flaccida della muscolatura del collo e delle ali. Nell'indagine è stato incluso anche il siero di un cane da caccia sintomatico che aveva ingerito parte di una carcassa di un uccello selvatico rinvenuta durante una battuta di caccia. Tutti i campioni sono stati testati mediante il metodo EndoPep-MS messo a punto come riportato di seguito.

### *EndoPep-MS*

500 µl di siero o 500 µl di contenuto intestinale diluito 1:1 in tampone fosfato gelatina sono stati addizionati di 20 µl di biglie coattate con gli anticorpi 8DC1.2 (legame con sierotipi C, C/D, D e D/C, University of California) e 4C2 (legame con sierotipi C e D/C, University of California) in proporzione 1:1 e successivamente incubati per un'ora a temperatura ambiente in agitazione mediante agitatore orbitale a velocità fissa. Le biglie sono state quindi catturate con l'ausilio di un supporto magnetico, il surnatante è stato scartato e le biglie sono state lavate per due volte con 1ml di PBST (Sigma Aldrich), una volta con 150µl di PBST ed infine con 80µl di acqua ultrapura (Sigma-Aldrich). Dopo aver rimosso tutta l'acqua, le biglie sono state risospese in 18µl di Reaction Buffer (10 mM Hepes buffer, 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA, 0,1 M DTT) e 2µl del peptide Pep-C (4). I campioni sono stati infine incubati in termociclatore a 37 °C over night. Al termine dell'incubazione 1 µl di ciascun surnatante è stato trasferito nell'apposito supporto per campioni dello strumento MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) ed è stato addizionato di 1µl di matrice costituita da una soluzione sovrasatura di acido α-ciano idrossi cinamminico (HCCA, Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando lo strumento Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics) ed il software FlexControl versione

3.3 (Bruker Daltonics) con un range di lettura da 720 a 5000  $m/z$ . Ciascuno spettro è stato acquisito in positive linear mode con una frequenza del laser di 30 Hz e una potenza del 30%. Per ciascun campione lo spettro finale è stato ottenuto dalla somma di 1000 shots ottenuti in gruppi di 100 in 10 diversi punti del campione. In tabella 1 sono riportati i risultati attesi per la combinazione tossina C/peptide.

Tossina + peptide	$m/z$		
BoNT-C + Pep-C	2912.3	[M+H] <sup>+</sup>	Assenza di tossina C
	1457.1	[M+2H] <sup>2+</sup>	
	1059.5	CT	Presenza di tossina C
	1870.9	NT	

**Tabella 1.** Risultati attesi dall'analisi con il MALDI-TOF. NT= frammento N terminale, CT= frammento C terminale, [M+H]<sup>+</sup>= massa attesa peptide integro monoprotonato, [M+2H]<sup>2+</sup>=massa attesa peptide integro diprotonato .

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 2 sono messi a confronto i risultati del *mouse bioassay* e dell'EndoPep-MS ottenuti per i 19 campioni di siero e il campione di contenuto intestinale.

Campione	Specie	Matrice	Mouse Bioassay	EndoPep- MS BoNT/C
5674/10	Anatra domestica	Siero	Tipo C	Positivo
8103/2/09	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
8103/10/09	Pollo	Siero	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
8103/13/09	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
2659/2/10	Pollo	Siero	Negativo	Negativo
2659/4/10	Pollo	Siero	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
2659/5/10	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
4691/11	Tacchino	Siero	Tipo C	Positivo
4863/13	Fagiano	Siero	Tipo C	Positivo
474/14	Cane	Siero	Tipo C	Positivo
5313/28/14	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
5313/29/14	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
5313/30/14	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
6289/3/14	Germano reale	Siero	Negativo	Negativo
6289/4/14	Germano reale	Siero	Negativo	Negativo
5993/15	Fagiano	Siero	Tipo C	Positivo
6353/15	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
6660/1/15	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
6660/2/15	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
5641/12	Cigno	Contenuto intestinale	Tipo C	Positivo

**Tabella 2.** Risultati del *mouse bioassay* e dell'EndoPep-MS ottenuti sui 20 campioni analizzati.

Come si può osservare in tabella 2, i campioni 8103/10 e 2659/4/10 risultati negativi alla prova biologica su topino sono invece risultati positivi all'EndoPep-MS. Entrambi erano stati prelevati da soggetti appartenenti ad un focolaio di botulismo confermato con la prova biologica eseguita su siero di altri soggetti. La positività riscontrata con L'EndoPep era chiara ma flebile ed è quindi plausibile che la non corrispondenza degli esiti sia dovuta alla presenza nel campione di una quantità di tossina al di sotto del limite di rilevabilità della prova biologica. Dalle prove effettuate finora l'EndoPep-MS sembrerebbe quindi più sensibile della prova biologica considerata il gold test per la diagnosi di botulismo.

## CONCLUSIONI

Le prove preliminari effettuate su campioni di siero e feci naturalmente contaminati ha permesso di verificare che il metodo EndoPep-MS per la rilevazione della tossina botulinica di tipo C è efficacemente applicabile allo strumento Bruker MALDI-biotyper che è sempre più diffuso nei laboratori di diagnostica clinica sia veterinari che umani per l'identificazione routinaria dei microorganismi. Oltre a concorrere alla corretta identificazione batterica lo strumento potrebbe trovare impiego anche per la rilevazione di importanti fattori di virulenza batterici, quali la neurotossina botulinica. Infatti, dalle prove finora eseguite, il metodo è risultato addirittura più sensibile rispetto al gold test per la diagnosi di botulismo, rappresentato dalla prova biologica su topino.

La sostituzione del *mouse test* con questo metodo in spettrometria di massa permetterebbe:

- una riduzione dei tempi di risposta (il tempo di risposta per il *mouse test* è infatti di 4 giorni mentre per l'EndoPep-MS sono sufficienti solamente 18 ore);
- una riduzione del costo dell'analisi;
- e soprattutto la sostituzione di animali da laboratorio utilizzati per la diagnosi di botulismo, pur garantendo una pari o addirittura migliore sensibilità.

I risultati del presente studio sono stati ottenuti nell'ambito della Ricerca Corrente RC IZS VE 05/12 intitolata "sviluppo di un metodo basato sulla spettrometria di massa per la rilevazione delle neurotossine botuliniche", finanziata dal Ministero della Salute.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arnon, S. S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat, and Working Group on Civilian Biodefense (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 285:1059-1070.
2. Boyer, A. E., M. Gallegos-Candela, R. C. Lins, Z. Kuklennyik, A. Woolfitt, H. Moura, S. Kalb, C. P. Quinn, and J. R. Barr (2011). Quantitative mass

spectrometry for bacterial protein toxins—a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis. *Molecules* 16:2391-2413.

3. Boyer, A. E., H. Moura, A. R. Woolfitt, S. R. Kalb, L. G. McWilliams, A. Pavlopoulos, J. G. Schmidt, D. L. Ashley, and J. R. Barr (2005). From the mouse to the mass spectrometer: detection and differentiation of the endoprotease activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77:3916-3924.
4. Hedeland, M., H. Moura, V. Baverud, A. R. Woolfitt, U. Bondesson, and J. R. Barr (2011). Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS. *J. Med. Microbiol.* 60:1299-1305.
5. Hill, K. K., T. J. Smith, C. H. Helma, L. O. Ticknor, B. T. Foley, R. T. Svensson, J. L. Brown, E. A. Johnson, L. A. Smith, R. T. Okinaka, P. J. Jackson, and J. D. Marks (2007). Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J. Bacteriol.* 189:818-832.
6. Kalb, S. R., J. C. Krilich, J. K. Dykes, C. Luquez, S. E. Maslanka, and J. R. Barr (2015). Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS. *J. Agric. Food Chem.*
7. Kalb, S. R., H. Moura, A. E. Boyer, L. G. McWilliams, J. L. Pirkle, and J. R. Barr (2006). The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal. Biochem.* 351:84-92.
8. Lindstrom, M., H. Korkeala (2006). Laboratory diagnostics of botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:298-314.

## ANALISI DELLA SEQUENZA COMPLETA DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA GENOTIPO ITA

Felice V.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>, Bonci M.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Giovanardi D.<sup>3</sup>, Pesente P.<sup>3</sup>, Mescolini G.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Silveira F.<sup>1</sup>, Lupini C.<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> *Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5, 37132, San Michele Extra (VR), Italia*

### Summary

The full-length genome of an Italian IBDV strain (ITA) was sequenced and compared with available full length IBDV sequences.

Amino acid residues previously observed in *very virulent* IBDV strains, as well as amino acid residues typical of non-virulent IBDV strains, were observed in the amino acid sequence of the ITA strain.

By the phylogenetic analysis, ITA strain did not show a close relationship with other known IBDV strains, neither recombination or reassortment events.

The currently available molecular data confirmed that ITA strain is a new genotype. Further investigations are needed to clarify its origin.

### INTRODUZIONE

*Infectious bursal disease virus* (IBDV) è l'agente eziologico della Bursite infettiva, malattia cosmopolita immunosoppressiva del pollo, ad alta contagiosità e impatto socio-economico elevato, a causa dell'aumentata sensibilità alle infezioni secondarie e alla risposta sub-ottimale alle vaccinazioni di routine. Si conoscono due sierotipi di IBDV, dei quali solo il sierotipo 1 è patogeno e distinto, in base al diverso grado di patogenicità e alle caratteristiche antigeniche, nei seguenti patotipi: classici, varianti, *very virulent* (vv), attenuati (Etteradossi & Saif, 2013). Dal punto di vista tassonomico, IBDV si inquadra nella famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. È caratterizzato da simmetria icosaedrica e privo di *envelope*, presenta un diametro variabile di 55-65 nm. Il genoma di IBDV è costituito da due segmenti di RNA a doppio filamento, il segmento A (3300 bp) e il segmento B (2800 bp). Il segmento A comprende due *open reading frames* (ORFs) parzialmente sovrapposte: ORF1 codifica la proteina non strutturale VP5 di 145 amminoacidi (aa) potenzialmente coinvolta nel processo di apoptosi virale (Carballeda *et al.*, 2015), ORF2 codifica una poliproteina (1012 aa), autoclivata nelle due principali proteine strutturali VP2 (1-512 aa) e VP3 (756-1012 aa) e nella proteasi VP4 (513-755 aa). La proteina VP2 è responsabile della produzione di anticorpi neutralizzanti, in quanto principale immunogeno. La proteina VP3 forma lo strato più interno del capsido, interagisce con VP1 e con il genoma ed è coinvolta nella replicazione e nell'assemblaggio virale (Deng *et al.*, 2007). La proteina non strutturale VP4 è una proteasi responsabile dell'autoprocessazione della poliproteina in VP2, VP4 e VP3 (Li *et al.*, 2012). Il segmento B codifica la polimerasi virale VP1 (1-879 aa), implicata in diversi eventi, quali replicazione virale, sintesi dell'RNA messaggero e incapsidamento,

conseguente all'interazione con VP3 (Lombardo *et al.*, 1999).

IBDV è soggetto a mutazioni, quali sostituzioni, inserzioni, delezioni e/o riassortimento genico che hanno portato all'evidenza di nuove varianti. A questo proposito, un emergente genotipo, denominato ITA, è stato recentemente segnalato in Italia. L'analisi filogenetica della regione ipervariabile della proteina VP2, ha mostrato che il ceppo ITA clusterizza separatamente, rispetto ai ceppi IBDV di referenza (Lupini *et al.*, 2016).

La sequenza parziale di un isolato non sempre risulta sufficientemente esaustiva ai fini della sua classificazione (Petkov *et al.*, 2007). Scopo del presente studio è stato quello di sequenziare l'intero genoma del ceppo ITA, al fine di completare la sua caratterizzazione molecolare e formulare ipotesi relative alla sua origine.

## MATERIALI E METODI

### *Virus*

Il ceppo ITA è stato coltivato in uova *Specific Pathogen Free* (SPF), secondo il protocollo di Rosenberger *et al.* (2009).

### *Estrazione dell'RNA virale e Reverse Transcriptase-PCR*

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata a partire dall'omogenato degli embrioni precedentemente inoculati, utilizzando un kit del commercio (QIAamp® Viral RNA Mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conformemente alle istruzioni della Ditta produttrice.

I segmenti genomici A e B erano amplificati seguendo il protocollo di Jackwood *et al.* (2006), modificato.

### *Sequenziamento*

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Milano, Italia), seguendo le istruzioni fornite dalla Ditta produttrice e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Bio-Fab Research, Roma, Italia).

### *Analisi filogenetica*

Le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche dei segmenti A e B sono state elaborate mediante il *software* Bioedit, allineate e confrontate con le sequenze di ceppi IBDV presenti nel database *GenBank*, utilizzando il programma Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Gli allineamenti sono stati eseguiti sia per ogni singolo segmento separatamente, sia per la concatenazione dei due utilizzando MAFFT (Katoh & Standley, 2013). Un network filogenetico basato sull'intero genoma è stato ricostruito mediante l'algoritmo NeighborNet implementato in SplitsTree4v4.12.3 (Huson & Bryant, 2010) ed è stata testata la presenza di eventi di ricombinazione all'interno dei dataset usando il Phi test. L'analisi di ricombinazione è stata inoltre eseguita su tutti i dataset usando RDP4 (Martin *et al.*, 2010). I parametri sono stati impostati seguendo il manuale RDP4. La presenza di *breakpoint* di ricombinazione è stata anche valutata usando GARD (Kosakovsky *et al.*, 2006). Gli alberi filogenetici sono stati ricostruiti a partire dai tratti non ricombinanti utilizzando un approccio di Maximum Likelihood (ML)

implementato in PhyML. Infine, un albero filogenetico è stato ricostruito usando Fasttree (Price *et al.*, 2010) a partire da una dataset di 1149 sequenze parziali di VP2. Per motivi di calcolo il database è stato ridotto eliminando le sequenze identiche.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi delle sequenze amminoacidiche del ceppo ITA ha evidenziato residui precedentemente descritti come *marker* di virulenza o evidenziati in ceppi virulenti (Petkov *et al.*, 2007; Lazarus *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2014; Lupini *et al.*, 2016), residui riportati in ceppi IBDV *non-virulent* o a ridotta virulenza (Wang *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013) e residui peculiari del ceppo ITA.

Per quanto riguarda i *marker* di virulenza, il ceppo ITA mostrava triptofano-137 nella VP5 e prolina-527 nella VP4.

Relativamente ai residui aa comuni a ceppi *v*IBDV, il ceppo ITA mostrava nella proteina VP1 treonina, acido glutammico e glicina alle posizioni 145-146-147. Come precedentemente riportato (Lupini *et al.*, 2016), il ceppo ITA mostrava nella proteina VP2 una regione eptapeptidica ricca in serina precedentemente descritta in ceppi *v*IBDV e gli aa Glutammina, Treonina e Glicina rispettivamente alle posizioni 249, 286 e 318, caratteristici dei ceppi classici.

Relativamente ai residui aa comuni a ceppi IBDV *non-virulent* o a ridotta virulenza, il ceppo ITA mostrava isoleucina-78 nella proteina VP5, alanina-990 e treonina-1005 nella proteina VP4 e isoleucina-4 nella proteina VP1.

Fenilalanina e arginina, alle posizioni 413 e 756, rispettivamente, della proteina VP1, sono state evidenziate quali caratteristiche peculiari del ceppo ITA.

Nell'analisi filogenetica sono stati analizzati complessivamente 47 genomi e il ceppo ITA ha mostrato una distanza genetica tra 0,044-0,168, 0,040-0,120 e 0,043-0,124 rispettivamente per il segmento A, per il segmento B e per il genoma completo. La presenza di alcune reticolazioni nel network filogenetico e i risultati Phi test fanno ipotizzare la presenza di frequenti eventi di ricombinazione/riassortimento tra i ceppi IBDV presi in esame. L'analisi RDP e GARD ha confermato questi risultati. Gli eventi di riassortimento e ricombinazione risultavano essere frequenti, sebbene nessuno di questi abbia interessato il ceppo ITA (Figura 1). In particolare, il riassortimento era evidenziato in 25 dei 47 ceppi analizzati, mentre la ricombinazione era evidenziata solo all'interno del segmento A, dove 21 ceppi mostravano un inserto di ricombinazione tra le posizioni 1169 e 1456. Solo due ceppi facevano eccezione, EU595670 (punti di ricombinazione 1-1351) nel segmento A e KC109816 (punti di ricombinazione 437-2087) nel segmento B. Poiché il numero delle sequenze complete dei genomi disponibili è limitato, i risultati qui descritti potrebbero non essere definitivi, così come la definizione degli *hot-spots* di ricombinazione. Gli alberi filogenetici confermavano l'assenza di una stretta relazione tra ITA e altri ceppi disponibili nelle banche dati. L'analisi dell'albero filogenetico del segmento A, dove il sierotipo 1 e 2 sono più divergenti, evidenziava che ITA, rispetto ad altri genotipi, è più vicino ai ceppi del sierotipo 2 (Figura 2). È quindi possibile ipotizzare che ITA sia un discendente di un gruppo originato in un passato remoto. Questi risultati sono stati confermati anche dall'analisi dell'albero filogenetico, basato su un elevato numero (i.e. 1149) di sequenze parziali della proteina VP2.

Possiamo quindi concludere che, all'analisi dell'intero genoma, il ceppo ITA si conferma essere un isolato IBDV geneticamente unico.

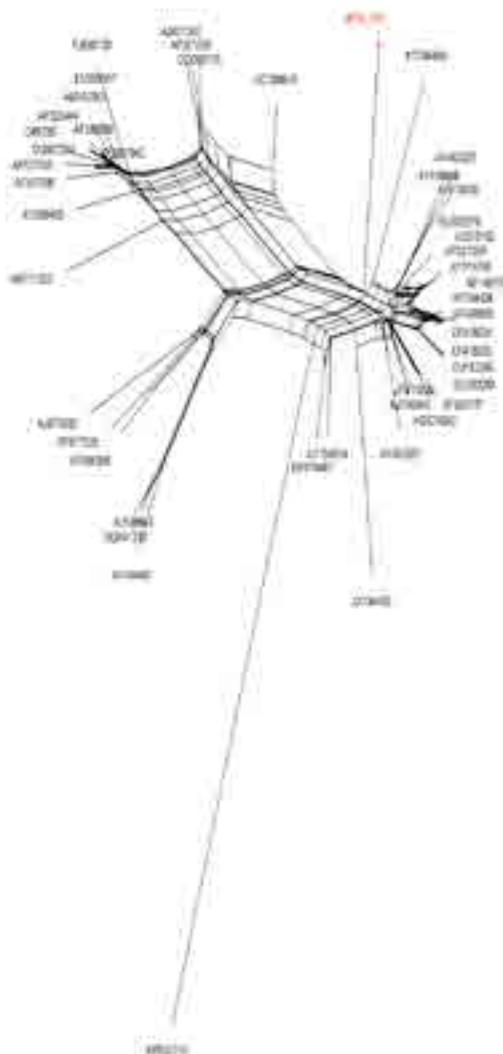
Il principale meccanismo di evoluzione dei virus a RNA è il loro alto tasso di sostituzione, che può causare emergenza di nuovi ceppi IBDV, in grado di superare l'immunità vaccinale (Etteradossi & Saif, 2013), come già evidenziato in altri virus a RNA (Catelli *et al.*, 2010). Eventi di ricombinazione omologa (He *et al.*, 2009; Jackwood, 2012) e fenomeni di riassortimento, possono avvenire naturalmente tra diversi ceppi IBDV (Wei *et al.*, 2006; Kasanga *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2013), ma il ceppo ITA non sembra essere coinvolto, lasciando aperti numerosi interrogativi sulla sua origine. La sequenza amminoacidica del ceppo ITA condivide residui aa con ceppi IBDV virulenti così come presenta aa già considerati *marker* di virulenza, soprattutto all'interno della proteina VP1. Tuttavia, l'analisi di sequenza ha evidenziato anche residui caratteristici di ceppi IBDV a minor grado di virulenza. Successivi studi di patogenicità *in vivo* sembrano necessari, allo scopo di meglio definire virulenza e patogenicità del ceppo ITA.

## BIBLIOGRAFIA

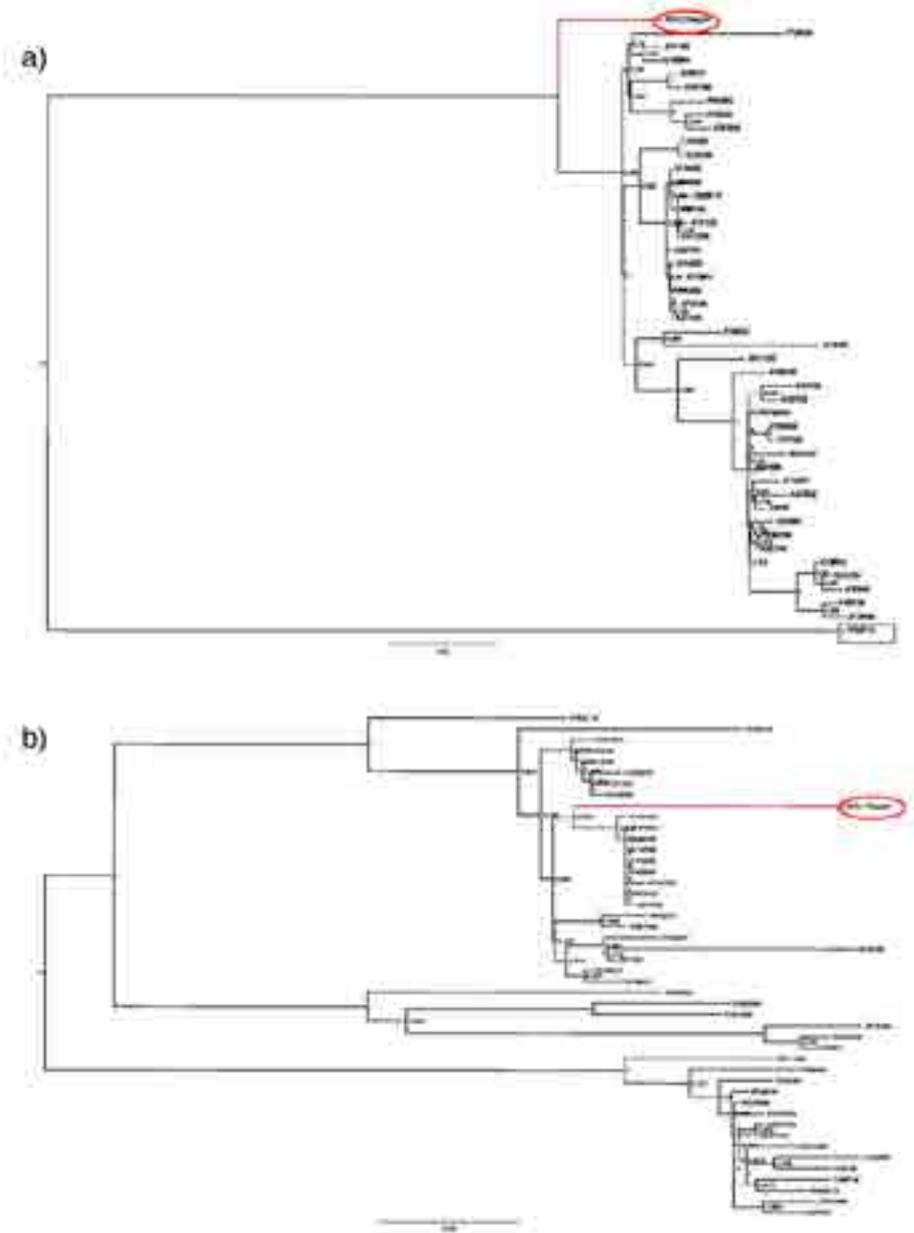
1. Carballada JM, Maroniche G, Lucero MS, Richetta M, Gómez E, Zoth SC and A Berinstein. (2015). Infectious Bursal Disease Virus non-structural protein VP5 is not a transmembrane protein. *Virology*. 483: 312–317.
2. Catelli E, Lupini C, Cecchinato M, Ricchizzi E, Brown P and CJ Naylor. (2010). Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity. *Vaccine*. 28: 916-921.
3. Cui P, Ma SJ, Zhang YG, Li XS, Gao XY, Cui BA and HY Chen. (2013). Genomic sequence analysis of a new reassortant infectious bursal disease virus from commercial broiler flocks in central China. *Arch Virol*. 158: 1973–1978.
4. Deng X, Gao Y, Gao H, Qi X, Cheng Y, Wang X and X Wang. (2007). Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus. *Virus Res*. 129: 35–42.
5. Etteradossi N and YM Saif. (2013). Infectious Bursal Disease. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Venugopal N (Eds), *Disease of Poultry*, 13th edn. Ames, Iowa State Press, pp. 219-246.
6. Gao L, Li K, Qi X, Gao H, Gao Y, Qin L, Wang Y, Shen N, Kong X and X Wang. (2014). Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J Gen Virol*. 95 (Pt 4): 888-897.
7. He CQ, Ma LY, Wang D, Li GR and NZ Ding. (2009). Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology*. 384: 51–58.
8. Hernández M, Villegas P, Hernández D, Banda A, Maya L, Romero V, Tomás G and R Pérez. (2010). Sequence variability and evolution of the terminal overlapping VP5 gene of the infectious bursal disease virus. *Virus Genes*. 41 (1): 59-66.
9. Huson DH and D Bryant. (2010): User Manual for SplitsTree4 V4.11.3.
10. Jackwood DJ, Cookson KC, Sommer-Wagner SE, Le Galludec H, De Wit JJ. (2006) Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis*. Dec, 50 (4): 532-536.
11. Jackwood DJ. (2012). Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 56: 574-577.

12. Kasanga CJ, Yamaguchi T, Munang'andu HM, Ohya K and H Fukushi. (2013). Genomic sequence of an infectious bursal disease virus isolate from Zambia: classical attenuated segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A. *Arch Virol.* 158: 685–689.
13. Katoh K and DM Standley. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 30 (4): 772-780.
14. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH and SD Frost. (2006). GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics.* 22 (24): 3096-3098.
15. Lazarus D, Pasmanik-Chor M, Gutter B, Gallili G, Barbakov M, Krispel S and Pitcovski J. (2008). Attenuation of very virulent infectious bursal disease virus and comparison of full sequences of virulent and attenuated strains. *Avian Pathol.* 37(2): 151-159.
16. Li Z, Wang Y, Xue Y, Li X, Cao H and SJ Zheng. (2012). Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in Infectious Bursal Disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J Virol.* 86(3): 1328-1338.
17. Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL and Rodriguez JF. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol.* 73(8):6973-83.
18. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M and E Catelli. (2016). A Molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.* Apr 25: 1-22.
19. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics.* 26 (19): 2462-2463.
20. Petkov D, Linnemann E, Kapczynski DR and HS Sellers. (2007). Full-length sequence analysis of four IBDV strains with different pathogenicities. *Virus Genes.* 34: 315–326.
21. Price MN, Dehal PS and AP Arkin. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS one.* 5(3): e9490.
22. Rosenberger JK, Saif YM and DJ Jackwood. (2009). Bursite infettiva. In: Dufour-Zavala L., Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, Woolcock PR. *Manuale di laboratorio isolamento, identificazione e caratterizzazione dei patogeni aviari*, Quinta edizione, American Association of Avian Pathologists. 195-197.
23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and S Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725-2729.
24. Wang Y, Qi X, Kang Z, Yu F, Qin L, Gao H, Gao Y and X Wang. (2010). A single amino acid in the C-terminus of VP3 protein influences the replication of attenuated infectious bursal disease virus in vitro and in vivo. *Antivir Res.* 87: 223–229.

25. Wei Y, Li J, Zheng J, Xu H, Li L and L Yu. (2006). Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 350: 277–287.
26. Yu F, Ren X, Wang Y, Qi X, Song J, Gao Y, Qin L, Gao H and X Wang. (2013). A single amino acid V4I substitution in VP1 attenuates virulence of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) in SPF chickens and increases replication in CEF cells. *Virology.* 440(2): 204-209.



**Figura 1.** Network filogenetico basato sull’algoritmo NeighborNet comprendente 47 genomi completi di IBDV (concatenazione dei segmenti A e B). Il ceppo IBDV ITA è evidenziato in rosso.



**Figura 2.** Albero filogenetico ricostruito mediante maximum likelihood a partire dagli allineamenti del segmento A (a) e B (b). la robustezza di ciascuna clade, valutata tramite Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT, è riportata in corrispondenza del rispettivo nodo. L'albero filogenetico del segmento A evidenzia che il ceppo ITA (cerchiato in rosso), rispetto ad altri genotipi, è più vicino a ceppi del sierotipo 2 (evidenziato dal rettangolo).

# SVILUPPO E APPLICAZIONE DI TEST DIAGNOSTICI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE E LA CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK CIRCOLANTI IN ITALIA

Fortin A.<sup>1</sup>, Cecchettin K.<sup>1</sup>, Drago A.<sup>1</sup>, Monne I.<sup>1</sup>, Piccirillo A.<sup>2</sup>, Davidson I.<sup>3</sup>, Terregino C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Legnaro (PD)*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Legnaro (PD)*

<sup>3</sup>*Kimron Veterinary Institute, Israele*

## Summary

Marek's disease (MD) is one of the most common lymphoproliferative diseases of chickens which causes mononuclear infiltration of different tissues and organs, such as peripheral nerves, gonad, viscera, muscle and skin. It is caused by an Alphaherpesvirus, called MDV or Gallid Herpesvirus 2 (GaHV-2). Although it has been studied in all its aspects from the early '60s and vaccines are now used all over the world, many issues remain unresolved due to the complexity of the disease. In order to activate specific surveys in the field, the IZSve has developed a series of molecular diagnostic methods for the MD. The development of these tests makes a rapid and robust diagnosis possible, allowing to distinguish the vaccine strains from those pathogens and to identify the pathotype in a short time. Samples from backyard farms, samples (environmental dust, feathers, spleens and livers) taken from an industrial flock of breeders in the first months of life, as well as samples from clinical cases of particular interest were analysed for validation of the methods. The data obtained so far confirm the high presence of Marek's disease in rural farms. The low number of outbreaks in industrial flocks lead us to believe that currently used chicken genetic lines and the vaccinations adopted are in most cases appropriate to counter the circulating viruses, which have mostly a medium-low pathogenic power. The detection of pathogenic viruses in the environment, even in farms with high standards of biosecurity which undergo intensive cleaning and disinfection cycles, highlights the importance of proper vaccination practices.

## INTRODUZIONE

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

La MD ha un impatto economico enorme sull'industria avicola in tutti i paesi del Mondo non solo per le differenti sindromi che provoca, alcune delle quali molto difficili da diagnosticare per assenza di sintomatologia manifesta, ma anche per i suoi effetti immunodepressivi che possono favorire infezioni secondarie causate da patogeni opportunisti o ridurre l'efficacia delle vaccinazioni per le diverse malattie.

Sebbene la MD sia stata ampiamente studiata in tutti i suoi aspetti dai primi anni '60 e sebbene i vaccini siano ormai utilizzati dappertutto, molte problematiche legate a questa malattia rimangono ancora irrisolte a causa della complessità della malattia stessa.

Al fine di attivare specifiche indagini conoscitive in campo, l'IZSV ha voluto sviluppare una serie di metodiche diagnostiche rapide per la MD. Allo stesso tempo, sono stati sviluppati anche test diagnostici rapidi per l'Anemia infettiva, un'altra malattia immunodepressiva del pollo per la quale è attualmente sconosciuta la situazione epidemiologica nel nostro Paese.

## MATERIALI E METODI

Per la validazione delle metodiche sono stati analizzati 168 campioni forniti dai laboratori diagnostici di Padova e Treviso, provenienti da allevamenti rurali identificati sospetti o positivi per la malattia di Marek a seguito di esame istologico. In seguito, sono stati analizzati diversi tipi di campioni (polvere ambientale, penne, milze e fegati) prelevati in un arco temporale di 16 settimane da un allevamento industriale di riproduttori in fase pollastra, per un totale di 108 campioni. Sono stati processati anche campioni provenienti da casi clinici di particolare interesse.

Le metodiche sviluppate sono state:

- Real-time PCR tipo Taqman per l'identificazione della malattia di Marek (MDV) adattato dal precedente lavoro di Davidson *et al.*, 2013;
- Real-time PCR tipo Taqman SYBR Green per discriminare i ceppi patogeni circolanti dai principali ceppi vaccinali (CVI988 e HTV) sviluppato *ex-novo*;
- PCR convenzionale con successivo sequenziamento per l'identificazione dei ceppi circolanti adattato dal lavoro di Mescolini *et al.*, (2015).
- Real-time PCR tipo Taqman per l'identificazione dell'anemia del pollo (CAV) adattato dal lavoro di Davidson *et al.*, 2013.

Le prime due metodiche utilizzano due set di *primer* e sonde descritti in letteratura (Davidson, *et al.*, 2013). Entrambe le metodiche hanno il medesimo ciclo termico, che prevede 3 minuti di attivazione della Taq polimerasi a 50°C, 95°C per 10 minuti di denaturazione iniziale e 40 cicli composti da una denaturazione di 95°C per 15 secondi e da uno *step* di *annealing* a 55°C per un minuto.

La metodica SYBR Green utilizza i seguenti *primer*: VPP22-F AGTCCAAATCTGAACGTACA e VPP22-R CGATTTGATTTCAATTCAC che sono stati sviluppati *in house* allineando diverse sequenze del gene VP22 presenti in banca dati, utilizzando il programma MEGA 5 per identificare una regione che presenta un *gap* nelle sequenze vaccinali rispetto ai ceppi *wild type*.

La reazione utilizza il kit di amplificazione QuantiTect SYBR® Green RT-PCR (Qiagen) col seguente ciclo termico: 50°C a 3 minuti per l'attivazione dell'enzima e 10 minuti a 95°C seguiti da 35 cicli composti da due *step*, il primo di denaturazione a 95°C per 15 secondi e il secondo di *annealing* a 55°C per 30 secondi. La curva di *melting* è stata effettuata da 65°C a 85°C con una *ramp* di 0,5°C. Per verificare la specificità del metodo sono stati testati i due vaccini più usati (CVI988 e il ceppo HVT); una differente temperatura di *melting* rende possibile la differenziazione dei vaccini più comuni dalle varianti *wild-type*.

Per la discriminazione dei ceppi circolanti è stata adottata una PCR convenzionale con *target* il gene Meq (Mescolini *et al.*, 2015) e successivo sequenziamento. L'amplificazione del materiale genetico è stata effettuata utilizzando i primer: MEQ-143F TTCCCTGACGGCCTATCTGA, MEQ-1008R AAGCTGAGCGTAAACCGTCC mediante il Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen). Il profilo termico contempla un'attivazione della DNA polimerasi a 95°C per 5 minuti, seguito da 40 cicli composti da una denaturazione a 95°C per 30 secondi, un'*annealing* a 65° C per 1 minuto e un'estensione a 72°C per 30 secondi, seguiti da un'estensione finale di 5 minuti a 72°C.

## RISULTATI

### *Allevamenti rurali*

I risultati delle due metodiche MDV e CAV effettuate su campioni provenienti da polli rurali sono riportati in tabella 1.

**Tabella 1:** risultati forniti dalle due metodiche rPCR di tipo Taqman su campioni di volatili rurali suddivisi per matrice

Organi esaminati	N° campioni identificati come sospetti o positivi alla malattia di Marek da esame istologico	N° positivi alla Real time PCR per virus della malattia di Marek	N° positivi alla rPCR per virus dell'anemia infettiva (CAV)
Fegato	43	31	23
Milza	32	23	19
Piume	34	24	17
Stomaco	32	20	24
Nervo sciatico	11	5	7
Rene	6	3	4
Ovidotto	3	1	0
Cuore	1	1	0
Intestino	1	1	1
Polmone	1	1	0
Timo	1	0	1
Sangue	3	2	-
TOTALE	168	112	96

I 112 campioni risultati positivi a MDV sono stati successivamente analizzati con la metodica SYBR green per l'individuazione dei ceppi vaccinali: 109 sono stati identificati come virulenti e 3 come ceppi vaccinali. I tre virus vaccinali sono stati individuati in episodi di "Paralisi transitoria".

*Monitoraggio ambientale in allevamento industriale*

In tabella 2 sono riportati i risultati delle rPCR per la Malattia di Marek divisi per matrici.

**Tabella 2:** risultati forniti dalle due metodiche rPCR di tipo Taqman e SYBRgreen per l'identificazione dei ceppi di MD da campioni di allevamento industriale suddivisi per matrice

	<b>Totale</b>	<b>Positivi MDV</b>	<b>Ceppi patogeni</b>	<b>Ceppi vaccinali</b>
Fegato	11	1	0	1
Milza	22	10	0	10
Penne	30	23	0	23
Polvere	20	15	0	15
Tamponi di polvere	25	19	12	7

Tutti i 108 campioni sono stati esaminati anche tramite real-time PCR per l'identificazione del virus dell'anemia infettiva e sono risultati tutti negativi.

Grazie al campionamento regolare dello stesso allevamento è stato possibile monitorare la presenza/circolazione del virus della malattia di Marek nell'arco di 16 settimane sia negli animali, tramite raccolta di organi e di penne da esemplari morti, sia nell'ambiente tramite raccolta di polvere presente in allevamento. I risultati sono riportati in tabella 3.

**Tabella 3:** Andamento della presenza di virus della malattia di Marek nell'arco delle 16 settimane di osservazione in un allevamento industriale

		<b>MDV/ totale</b>	<b>vaccinali/positivi</b>	<b>patogeni/positivi</b>
1 settimana	Fegato	0/3	0	0
	Penne	0/3	0	0
	Polvere	0/3	0	0
	Milza	10/12	10/10	0
2 settimana	Fegato	1/3	1/1	0
	Penne	2/3	2/2	0
	Polvere	0/3	0	0
	Milza	0/10	0	0
4 settimana	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	3/3	0/3	3/3
5 settimana	Fegato	0/3	0	0
	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	3/3	0	3/3
6 settimana	Fegato	0/2	0	0
	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	6/6	0	6/6
8 settimana	Polvere	3/3	3/3	0
9 settimana	Penne	3/3	3/3	0
10 settimana	Polvere	4/4	4/4	0
12 settimana	Polvere	3/3	3/3	0
13 settimana	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	2/3	2/2	0
14 settimana	Penne	5/6	5/5	0
	Polvere	2/5	2/2	0
16 settimana	Penne	1/3	1/1	0
	Polvere	1/2	1/1	0

#### *Focolaio in riproduttori pesanti*

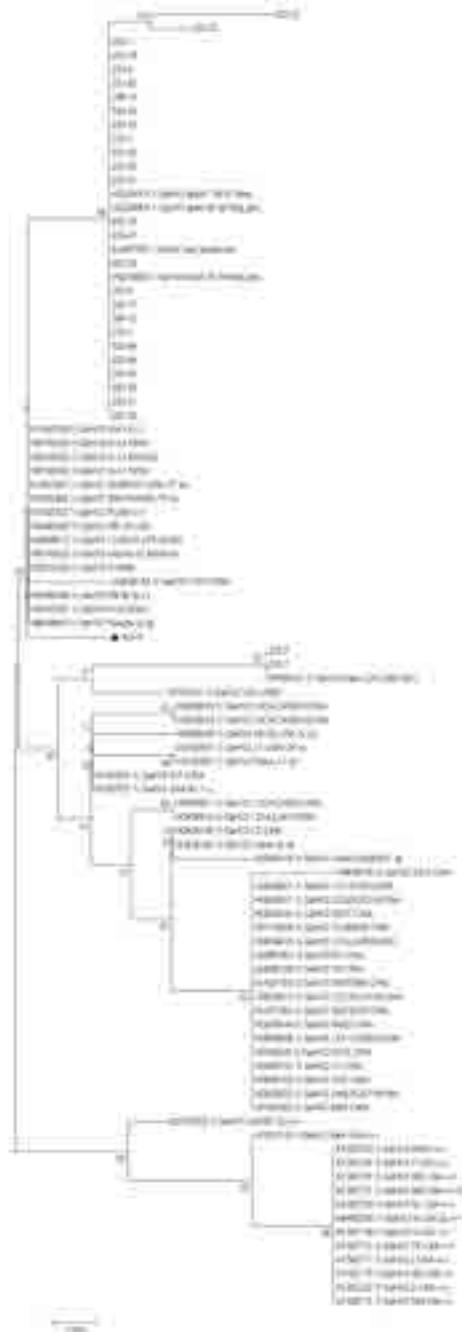
Ad aprile 2016 sono stati conferiti presso il laboratorio di Virologia Speciale dell'IZS Ve dei campioni di riproduttori pesanti in fase di deposizione, in cui era stato evidenziato incremento di mortalità e voluminose masse neoplastiche, prevalentemente a livello renale e intestinale, in soggetti sottoposti all'esame necroscopico. I campioni sono risultati positivi per MDV ceppo patogeno.

#### *Caratterizzazione dei ceppi circolanti*

Su alcuni campioni identificati come virulenti alla Real-Time PCR è stata effettuata l'ulteriore PCR convenzionale e sequenziamento che ha come *target* molecolare il gene *meq*.

A seguito della traduzione in aminoacidi della sequenza ottenuta è stato possibile creare un albero filogenetico (Fig.1).

**Figura 1:** Albero filogenetico generato con sequenze amminoacidiche.



▲ Sequenza di un virus identificato come vaccinale in PCR Real-Time

I virus individuati appartengono a genogruppi differenti. All'analisi filogenetica, la maggior parte dei ceppi (indicati nell'albero come 222-, 223-, 399-12) presenta un'omologia del 99% con ceppi isolati in Polonia (AC: KJ464785.1), mentre due (222-7 e 222-8) risultano omologhi al 99% con un ceppo individuato in India (AC: KF895031.1). Nonostante questa popolazione eterogenea, tutti i virus identificati condividono un *pattern* di virulenza basso, ad eccezione del virus (399-12) identificato nel corso del focolaio in riproduttori pesanti plurivaccinati. Dal *pattern* amminoacidico di virulenza (AEDQVCPPTP) questo ceppo è risultato avere caratteristiche simili ai ceppi *virulent* o *very-virulent* (Shamblin *et al.*, 2004).

## DISCUSSIONE

Lo sviluppo di questi test molecolari per la malattia di Marek rende possibile una diagnosi rapida e robusta per questa malattia, consentendo in breve tempo di distinguere i ceppi vaccinali da quelli patogeni circolanti e di individuarne il patotipo. Dalle prime analisi effettuate si conferma l'elevata presenza di virus della malattia di Marek negli allevamenti rurali.

Interessante anche il dato dell'elevata prevalenza del virus dell'anemia infettiva in questo tipo di allevamenti.

Le esigue segnalazioni di casi conclamati negli allevamenti industriali ci portano a pensare che attualmente le linee genetiche utilizzate e le vaccinazioni condotte siano idonee a contrastare nella maggior parte dei casi i virus circolanti, dotati per lo più di un potere patogeno medio-basso.

I metodi qui presentati si sono dimostrati adatti inoltre per l'analisi del virus in ambiente, cosa molto importante data l'elevata resistenza del virus all'esterno dell'ospite. Il riscontro di virus patogeni nell'ambiente, anche in allevamenti con alti standard di biosicurezza e sottoposti a intensi cicli di pulizia e disinfezione, sottolinea l'importanza di una corretta prassi di vaccinazione.

## BIBLIOGRAFIA

- Shamblin Christine E., Greene Natalie, Arumugaswami Vaithilingaraja, Dienglewicz Robert L., Parcels Mark S. (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.
- Davidson, I., Reibshstein I. and A. AlToury (2013). Quantitation of Marek's disease and chicken anemia viruses in organs of experimentally-infected and of commercial chickens by multiplex real-time PCR. *Avian Diseases*, 57(2), Suppl. 2013, 532-538.
- Mescolini G., Lupini C., Felice V., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Catelli E. (2015). Caratterizzazione molecolare di un ceppo MILD del virus della malattia di Marek evidenziato in polli rurali con forma nervosa. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria LIV Convegno Annuale Forlì, 16-17 Aprile 2015.

# **IMPATTO DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI SULLE DINAMICHE DI POPOLAZIONE DEL GENOTIPO QX DI BRONCHITE INFETTIVA E SULLA FREQUENZA DEI FOCOLAI**

Franzo G.<sup>1</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

*1) Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD) - Italia.*

*2) Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – Italia.*

## **Summary**

L'estrema variabilità e la rapida evoluzione del virus della bronchite infettiva (IBV) hanno sempre rappresentato la sfida principale per il suo controllo a causa della limitata cross-protezione fra i diversi ceppi. Vari studi sperimentali hanno dimostrato un incremento nello spettro di protezione qualora gli animali siano vaccinati con più genotipi differenti. Ciò non di meno, le condizioni e la tempistica di somministrazione della vaccinazione in campo sono a tal punto differenti che spesso una generalizzazione dei risultati sperimentali è quantomeno questionabile. Nel presente studio è stato utilizzato un approccio di tipo epidemiologico-filodinamico per ricostruire la storia demografica del principale genotipo di campo (i.e. genotipo QX) circolante in Italia. Centonovantacinque campioni raccolti nel periodo 2012-2016 sono stati sequenziati e analizzati. Ciò ha permesso di evidenziare come sia le dinamiche di popolazione di questo virus che la frequenza di focolai clinici siano state particolarmente variabili nel corso del tempo. Di particolare rilievo è risultata la forte associazione fra questi fenomeni e i cambiamenti nelle strategie vaccinali adottate. Ciò ha permesso di dimostrare il rapporto di causa-effetto fra la somministrazione/sospensione del vaccino per IBV e le ripercussioni in termini di dimensione della popolazione virale e, soprattutto, dell'occorrenza di episodi clinici indotti da IBV. È stato quindi possibile fornire una robusta dimostrazione dell'effetto protettivo indotto della vaccinazione nella pratica routinaria di allevamento. Inoltre, il resoconto qui riportato evidenzia l'importanza di pianificare con rigore non solo le strategie di controllo ma anche il loro monitoraggio e la loro valutazione, evitando di affidarsi a pareri soggettivi ed estemporanei.

## **INTRODUZIONE**

La bronchite infettiva rappresenta una delle malattie infettive più rilevanti per l'allevamento avicolo, essendo responsabile di ingenti perdite economiche ascrivibili principalmente a sindromi respiratorie e riproduttive, diminuzione della produttività e aumento della mortalità. Sebbene l'accurata gestione delle misure di biosicurezza e dell'allevamento in generale siano fondamentali per limitare la malattia, il suo controllo è ricercato principalmente tramite la diffusa somministrazione di vaccini. Sfortunatamente, come altri Coronavirus e virus a RNA+ il virus della bronchite infettiva (IBV) presenta un elevato tasso di mutazioni e di ricombinazione (Duffy et al., 2008, Thor et al., 2011). Ciò ha portato all'emergere di una molteplicità di varianti genetiche e antigeniche la cui cross-protezione è spesso limitata (Sjaak de Wit et al., 2011). IBV in Italia si caratterizza per un elevato impatto economico, elevata

prevalenza ed eterogeneità dei genotipi presenti. Sebbene comunemente vengano identificati 5 genotipi (i.e. QX (72%), seguito da 793/B (16%), Mass (8%), Q1 (3%) e D274 (1%)) (Franzo et al., 2014), il QX è di gran lunga quello più frequentemente associato a sintomatologia clinica e, con ogni probabilità, l'unica variante di campo rilevante. Sebbene lo sviluppo di vaccini basati su genotipi omologhi sia spesso impraticabile, è stato dimostrato come l'immunizzazione con vaccini diversi, basati su genotipi differenti, determini significativi benefici in termini di ampliamento dello spettro di protezione nei confronti di altri stipiti (Cook et al., 1999). Anche in Italia i protocolli vaccinali si sono conformati a questa teoria; i polli da carne in passato sono stati vaccinati con un vaccino basato sul genotipo Mass in incubatoio seguito da un richiamo con il genotipo 793B, solitamente a due settimane di vita, somministrato in acqua da bere. Recentemente è emersa una tendenza verso la somministrazione dei 2 vaccini a un giorno di vita. Tuttavia, i costi associati alla vaccinazione e rischi di reazioni vaccinali hanno indotto diversi gruppi a sospendere o modificare i protocolli vaccinali nei confronti di IBV. In un recente studio è stato possibile dimostrare come questo abbia avuto un forte impatto sulla prevalenza dei genotipi circolanti, portando alla sostanziale scomparsa del genotipo 793B, di conseguente probabile origine vaccinale (Franzo et al., 2014). Tuttavia, il reale effetto di questi interventi sulle dinamiche della popolazione virale non è stata mai analizzato in dettaglio. Sebbene diversi studi sperimentali abbiano dimostrato l'efficacia della vaccinazione Mass+793B nel controllare l'infezione da QX (Terregino et al., 2008), la generalizzabilità di questi studi alle condizioni di campo deve essere fatta con cautela. Di contro, la raccolta della mole di dati necessaria per studi epidemiologici accurati è spesso resa impossibile da limiti economici e di fattibilità. Fortunatamente lo sviluppo di un adeguato *background* teorico e matematico ha permesso lo sviluppo di modelli in grado di ricostruire le caratteristiche evolutive e la storia demografica delle popolazioni di virus ad alto tasso evolutivo a partire dall'analisi delle loro sequenze, un metodo dimostratosi efficace per lo studio di diverse malattie di interesse umano e animale (Rodrigo and Felsenstein, 1999, Nelson et al., 2015, Lemey et al., 2009, Franzo et al., 2016).

Nel presente studio tale approccio è stato utilizzato per valutare l'effetto della sospensione e reintroduzione della vaccinazione con il genotipo 793B sulle dinamiche di popolazione del genotipo QX in Italia e sulla frequenza degli episodi di sintomatologia clinica da esso indotti.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campioni*

I campioni inclusi nel presente studio (*pool* di tamponi tracheali o cloacali o omogenati d'organo) sono stati ottenuti da 562 allevamenti di broiler dislocati nel Nord Italia nel periodo compreso fra Novembre 2012 e Aprile 2016. In tutti i casi gli animali presentavano sintomatologia potenzialmente ascrivibile a infezione da IBV. Per ciascun campione sono stati registrati i dati inerenti alla data di campionamento, all'età degli animali, alla condizione clinica e alla localizzazione geografica degli allevamenti. L'arco temporale considerato può essere sinteticamente diviso in 5 fasi, differenziabili per il protocollo vaccinale applicato: fino alla tarda estate 2013 gli animali sono stati routinariamente vaccinati con Mass (1 gg di vita) e 793b (14 gg di vita), successivamente la vaccinazione in campo con il genotipi 793B è stata so-

spesa fino a Novembre 2014. Tuttavia, nel periodo Dicembre 2013 - Giugno 2014 è stata eseguita una vasta prova di campo con un vaccino 793B da poco registrato. A partire dal Dicembre 2015 tutti gli animali sono stati nuovamente vaccinati con la combinazione di vaccini IBV Mass+793 o Mass+QX, per lo più a un giorno di vita. Le scelte manageriali qui descritte hanno interessato la maggior parte, se non tutta, la popolazione avicola considerata.

#### *Diagnosi di IB e sequenziamento*

I campioni sono stati estratti utilizzando il kit commerciale NucleoSpin® 8/96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) e la diagnosi eziologica eseguita tramite real-time RT-PCR (Quantification of Avian Infectious Bronchitis Virus-IBV-kit; Genesig, Southampton, UK). Una regione ipervariabile del gene S è stata sequenziata utilizzando i primer XCE1-XCE2 (Cavanagh et al., 1999). Gli amplificati così ottenuti sono stati sequenziati in entrambe le direzioni tramite metodo Sanger, la loro qualità valutata utilizzando FinchTV (<http://www.geospiza.com>) mentre la sequenza consenso è stata ottenuta con CromasPro (CromasPro Version 1.5).

#### *Analisi delle sequenze*

Tutte le sequenze ottenute sono state allineate al database di referenza proposto da Valastro et al. (2016) (Valastro et al., 2016) usando MAFFT (Katoh and Standley, 2013). La presenza di fenomeni di ricombinazione è stata analizzata utilizzando RDP4 (Martin et al., 2010) e le sequenze ricombinate sono state escluse dall'analisi. Un albero filogenetico è stato quindi ricostruito mediante PhyML (Guindon et al., 2010) ed utilizzato ai fini della classificazione delle sequenze. Il miglior modello di sostituzione è stato selezionato sulla base del Bayesian information criteria (BIC), calcolato utilizzando jmodeltest (Darriba et al., 2012). Un nuovo dataset è stato definito selezionando tutte le sequenze ottenute da stipiti del genotipo QX circolante in Italia. I parametri e le dinamiche di popolazione nel tempo sono state ricostruite utilizzando un metodo basato sulla teoria della Coalescente, implementato in BEAST (Drummond et al., 2012).

#### *Focolai clinici*

Nel presente studio il numero di focolai clinici riferibili a IB è strettamente correlato al numero di sequenze ottenute poiché tutti i campioni positivi campionati durante gli episodi di malattia manifesta sono stati processati per il sequenziamento e la genotipizzazione. Per valutare la relazione fra variazioni nelle dinamiche della popolazione virale e la frequenza dei focolai ne è stata calcolata la correlazione. Considerando una possibile latenza temporale fra variazioni nella popolazione dei ceppi IBV genotipo QX e le ripercussioni cliniche, tale analisi è stata ripetuta correlando le dimensioni della popolazione virale (i.e. la così detta diversità genetica relativa; *effective population size* ( $N_e$ ) x *generation time* ( $\tau$ )) con il numero di focolai traslati in un range di  $\pm 8$  mesi.

## **RISULTATI**

### *Storia demografica della popolazione virale*

Dai campioni considerati nel presente studio sono state ottenute 195 sequenze di stipiti classificati come QX, corrispondenti a una regione di 269 nucleotidi del gene S1. La ricostruzione delle dinamiche della popolazione virale nel tempo ha rivelato la presenza di pattern assai complessi. A partire dal *Most Recent Common Ancestor* (MRCA) (i.e. 2011,94; 95HPD 2011,70-2012,02) la popolazione virale è aumentata

rapidamente fino alla fine del 2012 quando è diventata sostanzialmente stabile. Una diminuzione transitoria è stata osservata all'incirca fra Dicembre 2013 e Giugno 2014, seguita da un nuovo drammatico incremento che ha raggiunto l'apice durante Febbraio 2015. Il trend successivo si è caratterizzato per una progressiva diminuzione, prima marcata poi meno evidente, che ha portato al raggiungimento di valori comparabili a quelli riscontrati all'inizio dello studio (Fig. 1).

#### *Focolai di IB*

Un totale di 527 focolai potenzialmente ascrivibili a IBV sono stati identificati e sottoposti a diagnosi differenziale utilizzando metodiche di biologia molecolare. In 356 casi è stata effettivamente evidenziata la presenza di ceppi di IBV ascrivibili a quattro genotipi fra cui il QX è risultato nettamente il più rilevante. Brevemente, sono stati identificati 253 (71,06%) QX, 65 (18,25%) 793B, 32 (8,98%) Mass e 5 (1,40%) Q1. Il numero di focolai indotti da QX è risultato altamente associato alle dimensioni della popolazione virale ed in particolare la correlazione è risultata massima quando la diversità genetica relativa è stata correlata con il numero di focolai riscontrati 3 mesi dopo. Più nello specifico, una correlazione di 0,78 è stata osservata con il numero totale di episodi clinici mentre i valori di  $r$  sono risultati di 0.39, 0.61, 0.21 e 0.78 rispettivamente per il genotipo 793/B, Mass, Q1 and QX.

## **DISCUSSIONE**

La bronchite infettiva rappresenta la principale patologia infettiva che colpisce gli allevamenti avicoli nei paesi sviluppati e impone un rilevante sforzo gestionale e ingenti costi per il suo controllo. Il genotipo QX è probabilmente uno dei più rilevanti a livello mondiale e studi condotti sul nostro territorio hanno confermato questa evidenza (Sjaak de Wit et al., 2011, Franzo et al., 2014, Jackwood, 2012). Diverse prove sperimentali hanno più volte confermato che la somministrazione di una combinazione di vaccini basati sul genotipo Mass (a un giorno di vita) e 793B (a 2 settimane di vita) determina lo sviluppo di un'immunità protettiva anche nei confronti di questo genotipo (Terregino et al., 2008). Sfortunatamente la mancanza di adeguate prove di campo e dati epidemiologici ha ostacolato la valutazione dell'efficacia di questi vaccini in un contesto reale. Questo, associato all'occorrenza di più o meno sporadiche reazioni post-vaccinali e alla mancanza di un'oggettiva valutazione del rapporto costi-benefici ha fatto emergere, anche in Italia, un certo scetticismo sull'uso della vaccinazione, favorendo l'interruzione della sua somministrazione, in particolare della seconda dose, in allevamento, di 793B (Franzo et al., 2014).

Paradossalmente questo ci ha fornito la straordinaria possibilità di valutare sistematicamente, utilizzando un approccio epidemiologico e di filodinamica, l'importanza della messa in atto di adeguate strategie vaccinali. L'uso di modelli matematici basati sulla teoria della Coalescente e delle sue successive evoluzioni si è dimostrata utile in diversi studi orientati alla comprensione delle dinamiche epidemiologiche di diversi virus umani e animali. In particolare, questi metodi permettono la ricostruzione dell'evoluzione e della storia demografica delle popolazioni virali mediante lo studio della "traccia" che questi elementi lasciano nel patrimonio genetico del patogeno (Drummond et al., 2005). Conseguentemente le stime ottenute non dipendono direttamente dall'attività di campionamento, permettendo quindi di studiare periodi temporali per i quali non sono disponibili dati e minimizzando l'inevitabile *bias* legato all'intensità di campionamento.

Per poter considerare efficace un vaccino è necessario che questo sia in grado di limitare la diffusione dell'infezione e controllare la gravità e la frequenza dei focolai. Il peculiare scenario Italiano ha permesso di valutare questa ipotesi comparando, in diversi momenti temporali, la popolazione di IBV genotipo QX in condizioni di diversa esposizione al vaccino (i.e. esposto; non-esposto). Appare evidente che la combinazione Mass-793B è risultata in grado di controllare, almeno parzialmente, la diffusione di ceppi QX durante la prima fase dell'epidemia, confermando quindi i risultati delle prove sperimentali (Terregino et al., 2008). Sebbene il riscontro di episodi di sintomatologia clinica evidenziati nel presente studio strida con quanto usualmente riportato in corso di infezioni sperimentali, è bene ricordare come in condizioni di campo la somministrazione del vaccino sia spesso sub-ottimale. Questo, associato alla presenza di altri co-fattori può facilmente giustificare l'assenza di una protezione assoluta. Dopo la sospensione della vaccinazione lo scenario epidemiologico rimase immutato per circa un anno. La transitoria diminuzione della popolazione virale stimata fra dicembre 2013 e giugno 2014 rispecchia temporalmente l'esecuzione di una prova di campo su larga scala effettuata utilizzando un nuovo vaccino da poco registrato, anche esso basato sul genotipo 793B. Ciò può far supporre una maggiore efficacia di questa strategia rispetto alle precedenti. Tuttavia, le aziende da noi seguite decisero di interrompere questo piano poiché la riduzione nel numero dei focolai fu considerata non rilevante. A questa decisione è seguito un drammatico aumento nella popolazione virale che ha preceduto di circa 2-3 mesi il picco del numero di casi clinici. Questa evenienza conforta l'insufficiente protezione indotta dal solo genotipo Mass, già evidenziata in studi sperimentali (Sun et al., 2011). Il ritardo fra l'incremento della popolazione di QX e le ripercussioni cliniche è probabilmente ascrivibile alla necessità di raggiungere un'elevata pressione infettante, una ipotesi che può anche esser addotta per spiegare l'apparente limitata efficacia dell'introduzione del nuovo vaccino 793B. Infatti, è possibile che un carico virale relativamente basso possa essere tollerato senza che questo esiti in episodi di sintomatologia conclamata. Risulta più ostico spiegare le ragioni del lungo intervallo di tempo intercorso fra la prima rimozione della vaccinazione e le sue ripercussioni. Altri fattori concomitanti quali co-infezioni, fattori climatici, varie scelte manageriali, etc. possono aver contribuito a questo fenomeno e renderanno necessari ulteriori approfondimenti. Lo scenario qui riportato e la relativa mancanza di informazioni evidenzia ancora di più la necessità di una sistematica e rigorosa valutazione degli effetti a lungo termine delle politiche manageriali. Difatti, valutazioni soggettive ed estemporanee possono esitare in distorsioni drammatiche nella nostra conoscenza del panorama e delle dinamiche epidemiologiche con esiti economicamente rilevanti. Dopo la reintroduzione della vaccinazione gli effetti sia sulla circolazione virale che sulla presenza di sintomatologia sono stati immediati, ripristinando una situazione comparabile a quella iniziale e supportando di conseguenza un forte nesso causale fra i due eventi. Fra i fattori che possono aver contribuito al grande successo del nuovo intervento due meritano particolare attenzione. In primo luogo si è iniziato a vaccinare parte della popolazione Italiana di broiler con dei vaccini basati sul genotipo QX, per il quale è ragionevole assumere che sia in grado di indurre un'immunità ottimale nei confronti di ceppi omologhi (Geerligts et al., 2011). In seconda istanza, in particolare nell'ultimo anno, si è osservato un trend crescente verso la somministrazione spray di entrambi i vaccini (Mass e 793B) a un giorno di vita. Tradizio-

nalmente si ritiene che i benefici di una doppia vaccinazione siano massimizzati quando le stesse sono somministrate a circa 2 settimane di distanza (Sjaak de Wit et al., 2011). Data l'apparente contraddizione, è probabile che i vantaggi legati alla nuova strategia siano ascrivibili ad una maggiore standardizzazione e copertura vaccinale e ad una diminuzione delle reazioni avverse rispetto alla somministrazione in allevamento a 14gg di età.

Parallelamente questo studio ha permesso di fornire ulteriori evidenze sulla probabile origine vaccinale del genotipo 793B in Italia. In un precedente studio era stato riportato come l'interruzione della somministrazione di questo vaccino in un cospicuo numero di allevamenti ne avesse comportato una sostanziale scomparsa (Franzo et al., 2014). In questo studio di "follow-up" solamente quattro stipiti 793B sono stati identificati durante il periodo di "non vaccinazione" mentre, a seguito della sua reintroduzione, il riscontro di stipiti 793B, indistinguibili da quelli vaccinali, è ridivenuto un evento frequente.

Complessivamente le analisi condotte hanno permesso di fornire un'estensiva panoramica dell'efficacia e utilità dei protocolli vaccinali adottati nel nostro paese per il controllo dell'infezione da IBV, genotipo QX. La presenza di una rilevante "latenza" fra l'attuazione di determinate scelte manageriali e le loro ripercussioni pratiche evidenzia l'azione di altri fattori (biologici, epidemiologici, casuali, etc.) nel mediare o ritardare gli effetti delle nostre strategie di controllo. Appare quindi doveroso sottolineare l'importanza di una pianificazione accurata non solo dei piani di controllo ma anche del loro rigoroso ed esteso monitoraggio e valutazione, rigettando la tentazione di confidare eccessivamente in impressioni soggettive ed estemporanee.

## **BIBLIOGRAFIA**

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

Cook, J.K., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B., 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477-485.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.

Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1185-1192.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969.

Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9, 267-276.

Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M., 2016. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 100, 269-280.

Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E., Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine* 32, 6765-6767.

Geerligs, H., Boelm, G., Meinders, C., Stuurman, B., Symons, J., Tarres-Call, J., Bru, T., Vila, R., Mombarg, M., Karaca, K., 2011. Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathol.* 40, 93-102.

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.

Jackwood, M.W., 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56, 634-641.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772-780.

Lemey, P., Suchard, M., Rambaut, A., 2009. Reconstructing the initial global spread of a human influenza pandemic: A Bayesian spatial-temporal model for the global spread of H1N1pdm. *PLoS Curr.* 1, RRN1031.

Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefevre, P., 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.

Nelson, M.I., Viboud, C., Vincent, A.L., Culhane, M.R., Detmer, S.E., Wentworth, D.E., Rambaut, A., Suchard, M.A., Holmes, E.C., Lemey, P., 2015. Global migration of influenza A viruses in swine. *Nature communications* 6.

Rodrigo, A.G., Felsenstein, J., 1999. Coalescent approaches to HIV population genetics. *The evolution of HIV*, 233-272.

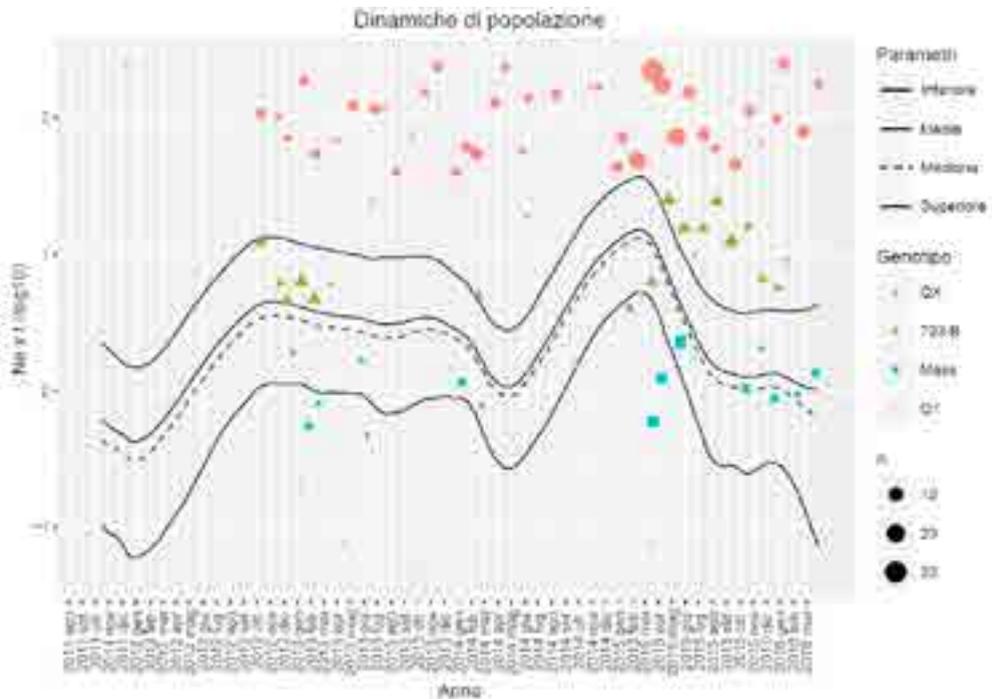
Sjaak de Wit, J.J., Cook, J.K., van der Heijden, H.M., 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223-235.

Sun, C., Han, Z., Ma, H., Zhang, Q., Yan, B., Shao, Y., Xu, J., Kong, X., Liu, S., 2011. Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains. *Avian Pathol.* 40, 43-54.

Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M., Capua, I., 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 37, 487-493.

Thor, S.W., Hilt, D.A., Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Jackwood, M.W., 2011. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3, 1777-1799.

Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I., 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution* 39, 349-364.



**Fig. 1.** Bayesian skyline plot delle dinamiche di popolazione dei ceppi Italiani di IBV genotipo QX. Media, mediana e intervallo superiore e inferiore di 95HPD (Highest Posterior Density) della diversità genetica relativa (i.e.  $Ne \cdot \tau$ ) sono riportati nel tempo. In numero di focolai mensili associati a ciascun genotipo è rappresentato mediante simboli le cui dimensioni sono proporzionali al numero dei focolai.

## POSSIBILE STRATEGIA DI CONTENIMENTO DEL *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN UN GRUPPO DI RIPRODUTTORI PESANTI

Gobbo F.<sup>1,2</sup>, Moronato M.L.<sup>1,2</sup>, Flaminio B.<sup>1</sup>, Boscarato M.<sup>1</sup>, Santone C.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTI - Laboratorio di Medicina Aviaria, Unità Operativa Micoplasmi, Viale dell'Università, 10, 35020, Legnaro, Padova (PD)*

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

### Summary

*Mycoplasma synoviae* (MS) is an important pathogen for the poultry sector causing economic losses in the different poultry categories, moreover its presence in Italy and in European countries is considered high. Like for other important poultry mycoplasmas the maintenance of mycoplasma-free breeders and culling of infected birds is considered the best control method. This approach is the best solution in the last phase of an eradication program where the prevalence of the pathogens is low, whereas if prevalence is high this approach could not be economical so different strategies should be adopted to stop or contain the transmission of MS. The aim of this study was to evaluate a specific program to control MS infection in a early detected MS positive breeder flock through pulsatile treatment with tylosin during the cycle of life. The MS isolate susceptibility to tylosin was monitored via MIC calculation (*Minimum Inhibitory Concentration*) at the beginning of the outbreak and at the end of the production cycle. Antibiotic treatment provide a useful tool for the containment of the spread of infection in the different houses of the farm and provided good production performance in the treated flocks. Then the MIC data suggest that the antibiotic treatment did not generate a selective pressure compromising the susceptibility of the MS isolate to this drug.

### INTRODUZIONE

*Mycoplasma synoviae* (MS) è considerato un patogeno della specie pollo, tacchino e delle specie minori allevate a fini industriali. La sua prevalenza nel territorio comunitario e nazionale è elevata, con conseguenti importanti ricadute economiche nei vari settori produttivi. Per tale motivo abbiamo assistito negli anni ad una maggiore consapevolezza della problematica con conseguente maggiore attenzione nella prevenzione e controllo di questo patogeno. La trasmissione di MS, come per altri importanti micoplasmi del settore avicolo industriale (*Mycoplasma gallisepticum*, *meleagridis* e *iowae*), può avvenire sia per via verticale che orizzontale. Storicamente il controllo di questi patogeni nel sistema avicolo si basava sulla formazione ed il mantenimento di gruppi PPLO-free (*Pleuropneumoniae like organism*). Tali misure si sono dimostrate efficaci nella riduzione della prevalenza per MI ed MM ed anche seppur con differenze geografiche per MG. Mentre sembrerebbe almeno sulla base delle prevalenze attuali, che per MS tali misure non siano state totalmente efficaci. Tale discrepanza potrebbe essere ascritta ad alcune particolarità del patogeno (biologiche ed epidemiologiche) ma con molta probabilità la causa è da ricercare in un

approccio meno attento alla problematica del settore produttivo, dato che per diversi decenni è stato considerato un patogeno minore almeno per il settore ovaioia ed il pollo da carne. Negli ultimi anni il suo impatto zootecnico è stato rivalutato anche in funzione del fatto di una nuova forma clinica nel settore della gallina ovaioia. La scelta della strategia di controllo delle micoplasmosi respiratorie può includere diversi approcci: eradicazione, depopolamento, compartimentalizzazione, biosicurezza, profilassi indiretta (vaccinazione), terapia antibiotica mirata, ma anche un insieme coordinato e strutturato dei diversi sistemi appena riportati. Non esiste una regola su quale misura adottare e tale decisione dovrebbe essere presa in funzione della situazione epidemiologica, della realtà produttiva o di altri fattori di natura commerciale. Nel presente studio si riportano i risultati dell'approccio antibiotico, tramite trattamento pulsatile con il macrolide tilosina, in un gruppo di riproduttori pesanti positivi per *Mycoplasma synoviae*.

## **MATERIALI E METODI**

Durante il consueto monitoraggio bimensile per MS e MG di un gruppo di riproduttori pesanti tramite ricerca in PCR da tamponi tracheali, collezionati in numero di 10 per capannone, si è evidenziata una positività per *Mycoplasma synoviae* in uno (cap. A) dei 5 capannoni testati (A, B, C, D, E) (40 settimane di età). Si è quindi provveduto ad effettuare immediatamente un campionamento aggiuntivo nel capannone positivo per l'isolamento colturale del ceppo circolante di MS e per effettuare lo studio di antibiotico suscettibilità tramite metodica MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Nel frattempo si è deciso di iniziare tempestivamente un trattamento mirato di attacco a base di tilosina (50g/hL) nel capannone in oggetto e in quello limitrofo (capannone A e capannone B); la scelta di tale farmaco è avvenuta utilizzando dei dati MIC su base storica per MS in possesso presso il laboratorio di Medicina Aviare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Parallelamente, in azienda sono state implementate le misure di biosicurezza per contenere la diffusione dell'infezione negli altri capannoni. Una volta effettuato l'isolamento del ceppo circolante ed eseguita la MIC con metodo delle microdiluzioni in brodo è stata confermata la suscettibilità al farmaco utilizzato e si è quindi proseguito con il trattamento pulsatile (50g/hL per 3 giorni ogni due settimane) per tutta la durata del ciclo produttivo. Tutti i 5 capannoni sono stati monitorati ogni 15 giorni per l'intero ciclo produttivo per evidenziare una eventuale diffusione del patogeno MS tramite metodiche di PCR e sierologiche (ELISA). A fine ciclo (62 settimane) si è provveduto a campionare un nuovo isolato batterico per effettuare il test MIC e valutare i valori di antibiotico suscettibilità.

## **RISULTATI**

La rottura da *Mycoplasma synoviae* si è instaurata nel capannone A a 40 settimane di vita con sieroconversione dopo 3 settimane, i capannoni limitrofi (capannone B e C) si sono positivizzati per MS a 45 settimane, il capannone D a 51 settimane ed infine il capannone E a 54 settimane. La valutazione dei titoli anticorpali per MS tramite metodica ELISA nei diversi capannoni ha dimostrato alti titoli nel capannone A (fino 1:23271) e titoli ben più bassi negli altri capannoni (media 1: 2000-1:6000). Il monitoraggio bimensile per *Mycoplasma gallisepticum* ha escluso la presenza di questo patogeno nell'intero ciclo produttivo. La valutazione dell'antibiotico suscettibilità

dell'isolato al momento della rottura (isolato MS T<sub>0</sub>) e dell'isolato a fine ciclo (isolato MS T<sub>f</sub>) presenti in tab. 1 dimostrano la conservata suscettibilità dei due isolati al macrolide tilosina se comparati con i *breakpoint* disponibili (S= $\leq$ 1  $\mu$ g/ML, I= $\leq$ 2  $\mu$ g/ML, R= $\geq$ 4  $\mu$ g/ML, Hannan *et al.*, 1997).

**Tab. 1** (valori di MIC espressi in  $\mu$ g/ML per le diverse molecole antibiotiche testate)

Farmaco	Doxiciclina	Enrofloxacin	Eritromicina	Florfenicolo	Lincomicina	Ossitetraciclina
<b>Isolato MS T<sub>0</sub></b>	0,50	>16	>8	<0,5	<0,5	1,00
<b>Isolato MS T<sub>f</sub></b>	0,50	>16	>8	2,00	1,00	1,00
	<b>Spiramicina</b>	<b>Tiamulina</b>	<b>Tilmicosina</b>	<b>Tilosina</b>		
<b>Isolato MS T<sub>0</sub></b>	<0,5	0,25	2,00	<b>0,125</b>		
<b>Isolato MS T<sub>f</sub></b>	1,00	0,50	8,00	<b>0,25</b>		

Si segnala inoltre che i dati di produzione del ciclo (N° uova/gallina accasata, N° uova incubabili, schiusa media, N° pulcini/gallina accasata, ecc. ecc.) sono risultati in linea con gli *standard* di riferimento e considerati migliori rispetto a gruppi di cicli precedenti MS-free, inoltre non si sono evidenziate problematiche riferibili ad MS nella progenie. La mortalità cumulativa a fine ciclo nel gruppo di riproduttori si è attestata al 7%.

#### Conclusioni e discussione

L'implementazione delle misure di biosicurezza/gestionali ed il controllo dell'infezione tramite trattamento pulsatile con tilosina, a nostro parere ha consentito una diminuzione della carica infettante limitando la diffusione del patogeno negli altri comparti dell'allevamento (dati supportati dalla tempistica di positivizzazione e dai titoli sierologici), il penultimo (D) e l'ultimo capannone (E) si sono positivizzati rispettivamente 11 e 14 settimane dopo la rottura nel capannone A. La diagnosi precoce (importanza del monitoraggio costante e ad intervalli brevi) associato al tempestivo intervento terapeutico ha consentito di contenere l'infezione nell'allevamento e di mimare un'infezione controllata senza generare l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza (AR) nei confronti del macrolide testato. I gruppi trattati hanno mostrato buone *performances* produttive e non si sono segnalate problematiche riferibili ad MS nella progenie. Il trattamento antibiotico nella categoria dei riproduttori può, in funzione della situazione epidemiologica del territorio o delle specifiche necessità del produttore, essere un utile mezzo per il controllo dell'infezione di MS,

se supportato nel tempo da valutazione dell'efficacia terapeutica tramite metodiche capaci di monitorare il mantenimento dell'antibiotico-sensibilità nei ceppi di interesse. Inoltre come è facile intuire trattare animali all'apice della piramide (riproduttori) permette in caso di impossibilità, per qualsivoglia motivo, dell'eliminazione del gruppo infetto di contenere il rischio di trasmissione del patogeno alla linea da produzione (carne o uova), riducendo conseguentemente nel settore carne trattamenti antibiotici per patologie secondarie alla micoplasmosi, e quindi nella bilancia finale di filiera una riduzione dell'utilizzo dei farmaci. Tale tipologia di approccio necessita sicuramente di ulteriori approfondimenti e conferme, dato che l'utilizzo anche prudente e ponderato dei farmaci in questa particolare fase storica, non sembra essere sempre del tutto compreso.

## **BIBLIOGRAFIA**

S.H. Kleven & N. Ferguson-Noel (2008). *Mycoplasma synoviae* infection. *Disease of Poultry* 12 th Ed., 845-856

Anneke Feberwee , Tjep S. de Vries & Wil J. M. Landman (2008). Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms, *Avian Pathology*, 37:6, 629-633, DOI: 10.1080/03079450802484987

Salvatore Catania, Dania Bilato, Federica Gobbo, Anna Granato, Calogero Terregino, Luciano Iob and Robin A. J. Nicholas. Treatment of Eggshell Abnormalities and Reduced Egg production Caused by *Mycoplasma synoviae* Infection. *Avian Diseases* 54:961-964, 2010

Catania Salvatore, Gobbo Federica, Fincato Alice, Kasic Tihana, Flaminio Barbara, Iob Luciano. Poster: Evaluation of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of 40 field strains of *Mycoplasma synoviae* isolated in EU. Book of Abstracts of XVIIth Congress of WVPA World Veterinary poultry Association, 19-23 August 2013, Nantes, France. Pag. 243

Catania S. e Gobbo F.. Diagnostica applicata alle micoplasmosi. Seminario in Epidemiologia e controllo delle micoplasmosi animali: buone pratiche di vaccinazione e terapia, Centro Congressi IZO, 5-6 Marzo 2014, Pavia, Italia. Pag. 12

Flaminio B, Fincato A., Sturaro A., Santone C., Gobbo F., Catania S.. Minimum Inhibitory Concentration of mycoplasma species: a chance for a practitioner, a challenge for the laboratorist. 3rd EAVLD Congress, Pisa 12th-15th October 2014. Pag. 36

Landman WJ., Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol.* 2014;43(1):2-8. doi: 10.1080/03079457.2014.881049.

## **STUDIO PRELIMINARE PER L'INDIVIDUAZIONE DI UN *EARLY WARNING SYSTEM* PER LA COCCIDIOSI NEL BROILER**

Grilli G.<sup>1</sup>, Borgonovo F.<sup>2</sup>, Ferrari L.<sup>1</sup>, Fontana I.<sup>2</sup>, Tullo E.<sup>2</sup>, Guarino M.<sup>2</sup>, Ferrante V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Medicina Veterinaria - via Celoria, 10, Milano*

<sup>2</sup> *Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Scienze veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare - via Celoria, 10, Milano*

### **Summary**

#### **Preliminary study for the identification of an early warning system for coccidiosis in broilers**

The main objective of this research was the individuation of an early warning system for the coccidiosis in broilers. One hundred and twenty Ross 308 one day old were reared at the facilities of the University of Milan. The broiler were kept into two rooms under the same ventilation system and rearing conditions. The group A was fed with a commercial broiler feed with coccidiostatic, the group B with the same diet without coccidiostatic. During the rearing period the chickens were weekly weighed; moreover, every week the air was sampled and analysed by an electronic nose in order to verify whether the MOS sensors were able to discriminate between healthy and sick animals. At the same time the litter was sampled in 5 points of the box in order to count the oocysts. The preliminary results showed the sensor capability to discriminate between group 1 and 2 even when the oocysts were only 250 opg. This system might be an useful tool for early detection of enteropathy in farmed animals kept under controlled environmental conditions.

### **INTRODUZIONE**

Il controllo dell'instaurarsi della coccidiosi è essenziale per l'ottimizzazione dell'allevamento del pollo da carne in quanto, dal punto di vista economico, questa patologia è una tra le più impattanti sull'allevamento del broiler.

Negli allevamenti intensivi il fattore ambiente e l'alta densità animale possono favorire lo sviluppo della coccidiosi. L'infestazione avviene attraverso la via digerente e la sintomatologia è caratterizzata da perdita di appetito e calo delle performance, scarsa uniformità nei gruppi, diarrea e, nei casi gravi, morte del soggetto colpito.

Le forme subcliniche, dove non si evidenzia mortalità, possono avere effetti negativi economicamente rilevanti in quanto le rese zootecniche sono inferiori, la qualità del prodotto finale non è ottimale e si assiste anche ad un incremento degli scarti al macello.

Per evitare tali perdite economiche, è di grande interesse individuare dei sistemi di controllo alternativi a quelli classici che permettano di evidenziare precocemente l'instaurarsi della patologia. In quest'ottica l'utilizzo di un sistema basato su sensori in grado di rilevare e caratterizzare i cambiamenti nella composizione dei composti volatili presenti in ambiente, può rappresentare una soluzione efficace, in grado di abbinare la semplicità d'uso con un controllo accurato del processo.

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare il possibile utilizzo di un naso elettronico dotato di sensori Metal Oxide Semiconductors (MOS) per rilevare precocemente

variazioni nella tipologia di composti volatili presenti nell'ambiente in cui vivono gli animali, in seguito ad infezione coccidica prima dell'evidenziazione di sintomatologia.

## **MATERIALI E METODI**

La prova è stata effettuata presso le strutture stabulative del Polo Veterinario di Lodi. 120 broilers maschi Ross 308 sono stati equamente suddivisi in due gruppi sperimentali di 60 pulcini che sono stati accasati, ad un giorno di età, in 2 stanze identiche munite di controllo automatico della ventilazione. In ogni stanza è stato allestito un box di 2 m x 3 m con un pavimento in cemento ricoperto da lettiera di truciolo di legno chiaro. Ciascun box era dotato di 2 mangiatoie a tramoggia e 2 abbeveratoi a campana. Per la gestione ambientale delle temperature ci si è basati sulle indicazioni fornite dalla casa produttrice dell'ibrido. I pulcini nella stanza 1 (gruppo A) sono stati alimentati con un mangime commerciale per polli da carne con aggiunta di coccidiostatico (Robenidina a 33 ppm) mentre i pulcini nella stanza 2 (gruppo B) sono stati alimentati con un mangime identico ma privo di coccidiostatico.

### Rilievi zootecnici e sanitari

Nel corso del periodo di accrescimento sono stati rilevati i seguenti parametri: peso individuale settimanale, peso del mangime somministrato giornalmente, residuo mangime settimanale per valutare l'indice di conversione alimentare del gruppo (ICA) e conteggio settimanale delle oocisti presenti nella lettiera (prelievo in 5 punti dei box) secondo la metodica di Mc Master.

### Monitoraggio con naso elettronico

La raccolta dei campioni d'aria nelle due unità sperimentali è stata eseguita utilizzando una "pompa a polmone" al cui interno è stato posto un sacchetto di Nalophan. Il campionamento è stato eseguito, in entrambe le stanze, durante l'intero ciclo (45 giorni) con una frequenza settimanale, in concomitanza con il prelievo della lettiera per la conta delle oocisti.

I campioni di aria sono stati analizzati in laboratorio mediante l'utilizzo di un'unità di campionamento composta da 10 sensori caldi di tipo MOS (Wilson *et al.*, 2009; Marchesi *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2013).

Le performance produttive sono state analizzate tramite ANOVA mentre i dati relativi ai composti volatili presenti nell'ambiente di allevamento sono stati analizzati mediante l'analisi delle componenti principali (PCA) (Borgonovo *et al.*, 2013).

## **RISULTATI**

Dal punto di vista delle performance i due gruppi non hanno mostrato differenze statisticamente significative.

Nel corso delle 7 settimane di allevamento il gruppo controllo (gruppo A) ha mantenuto una carica di oocisti pari a zero, mentre il gruppo trattato (gruppo B) ha presentato un andamento crescente di oocisti (250 opg al giorno 14; 24.000 opg al giorno 21 e 37.300 al giorno 28 per poi gradualmente decrescere). Nel corso della prova è deceduto solo un soggetto per gruppo e la necropsopia ha confermato la presenza di coccidi nel soggetto del gruppo B. Per quanto riguarda i dati relativi all'analisi dei campioni di aria, i sensori utilizzati hanno dimostrato la capacità di individuare le variazioni di composti volatili tra i due gruppi già quando il gruppo B presentava l'inizio dell'infezione da coccidi, con una conta pari a 250 opg (Figura 1). In Figura 2 sono riportate le impronte odorose individuate nei gruppi A e B.

## DISCUSSIONE

I pulcini utilizzati nella prova non hanno mostrato nessuna sintomatologia ascrivibile a coccidiosi o ad altre patologie intestinali clinicamente evidenti. La mortalità è stata irrisoria anche se nel soggetto del gruppo B era evidente la presenza di coccidi a vari stadi di sviluppo, nei tratti intestinali interessati dalle infezioni da *Eimeria acervulina*, *E. maxima* ed *E. tenella*. La scelta di utilizzare la Robenidina come coccidiostatico, abbastanza inusuale negli allevamenti intensivi da carne, è stata dettata dalla necessità di non avere molecole che potessero interferire con il normale sviluppo della flora microbica intestinale.

Per quanto riguarda il risultato dell'analisi dei campioni d'aria, effettuata con il naso elettronico, l'utilizzo di 10 sensori ha permesso di differenziare i due gruppi già con un'infezione iniziale da coccidi (250 opg), con un potere discriminante del 94,5% (Figura 1) mentre è stato possibile isolare 5 sensori in grado di discriminare gli animali sani rispetto a quelli con presenza di oocisti con un potere discriminante del 79%. Tale parametro indica il grado di separazione tra i gruppi analizzati, i valori prossimi all'unità rappresentano la bontà della misura. Ogni analisi ha permesso graficamente di identificare un'"impronta odorosa" caratteristica che è tipica dei gruppi sani o infetti come evidenziato in Figura 2.

Per confermare questi primi dati saranno necessari ulteriori campionamenti in modo da definire l'impronta odorosa specifica per la patologia enterica considerata.

## CONCLUSIONE

Da questi primi risultati appare evidente la possibilità di mettere a punto un sistema in grado di individuare in maniera precoce e *user-friendly* la presenza di coccidi nei broilers, aprendo uno scenario interessante per gli operatori del settore. Se lo strumento, ancora in fase di studio, confermasse la sua affidabilità come supporto diagnostico anche in campo, potrebbe essere utilizzato per individuare precocemente le enteropatie in tutte le specie allevate in ambiente controllato in quanto in grado di valutare ogni squilibrio nella emissione di composti volatili originati dal contenuto intestinale ed emessi dalle feci..

I risultati illustrati sono oggetto della domanda di brevetto italiano n. 102016000059153 depositata il 9 giugno 2016.

## BIBLIOGRAFIA

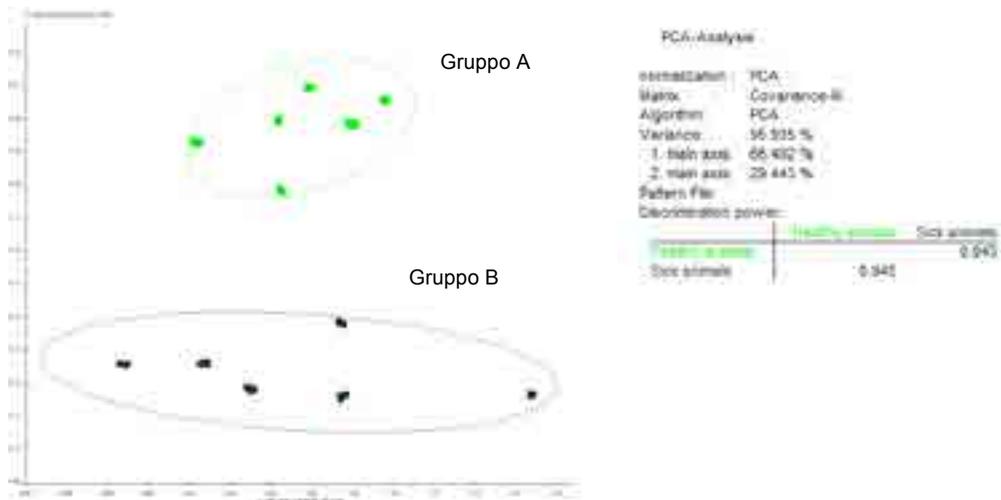
Borgonovo F., Costa A., Lazzari M., 2013. First tests of using an electronic nose to control biogas plant efficiency. *Journal of Agricultural Engineering* 2013; volume XLIV(s1):e109, pp 550-553

Marchesi M., Araldi F., Bertazzoni B., Zagni M., Lini D., Navarotto P., Baldini C., Coppolecchia D., Borgonovo F., 2013. Pretrattamenti delle matrici per l'alimentazione del digestore anaerobico. *Quaderno della ricerca n. 150*, Regione Lombardia.

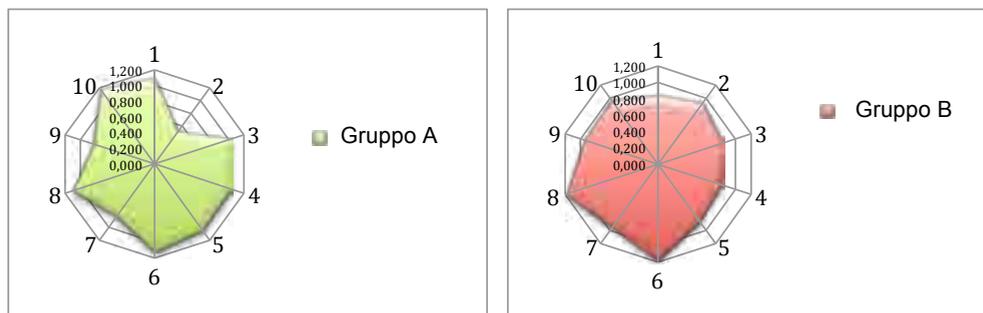
Rahman S., Usmani T., Saeed S.H., 2013. Review of electronic nose and applications. *International Journal of Computing and Corporate Research*. International Manuscript ID : ISSN2249054X-V3I2M2-032013; Vol. 3 ISSUE 2 March 2013

Wilson A.D. and Baietto M., 2009. Applications and Advances in Electronic-Nose Technologies. *Sensors*, 9, 5099-5148; doi:10.3390/s90705099

**Figura n.1** Analisi delle componenti volatili principali



**Figura n. 2** Mappatura dei composti volatili nell'aria ambientale di allevamento nei due gruppi A e B a 21 giorni di vita.



# **PATOGENICITÀ DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA GENOTIPO ITA IN POLLI SPF**

Lupini C.<sup>1</sup>, Silveira F.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>3</sup>, Meini A.<sup>3</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Mescolini G.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</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> *Ceva Salute Animale, Via Bartolomeo Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB) - Italia*

## **Summary**

Infectious bursal disease virus (IBDV) genotype ITA was detected in Italy in IBD-live vaccinated broilers in 2011. The aim of this study was to evaluate in experimental conditions the pathogenicity of ITA genotype in SPF chickens. Birds were inoculated at 35 days of life and observed up to 28 days post-infection (dpi). At specific time points 5 birds were euthanized, subjected to post-mortem examination and sampled. Histopathology of Bursa of Fabricius was performed and tissue distribution was evaluated by qRT-PCR. No clinical signs nor mortality were recorded. At necropsy Bursas of Fabricius showed enlargement and oedema in the acute phase (2nd dpi) of the infection, followed by persistent atrophy, which lasted until the end of the trial. Histology of the Bursa showed lymphocyte depletion, cystic cavities and poor regeneration process. IBDV RNA was persistently detected in bursal tissues until the end of the trial; ITA genotype was also frequently detected in other tissues collected such as thymus, cecal tonsil and spleen. This study showed that ITA genotype, though it has a subclinical course, causes a severe and persistent damage of Bursa tissues. Its circulation in broilers might be a threat for the poultry industry.

## **INTRODUZIONE**

La bursite infettiva è un'importante malattia del pollo causata da un avibirnavirus denominato Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). I quadri clinici possono variare, a seconda della patogenicità del ceppo virale, da forme molto gravi con mortalità ed immunodepressione a forme subcliniche in cui l'aspetto saliente è esclusivamente la immunodepressione. Indipendentemente dal grado di patogenicità del ceppo coinvolto e dalla gravità del quadro clinico, l'infezione da IBDV si accompagna sempre ad un danno a carico della borsa di Fabrizio. Nel 2011 sono stati isolati in Italia, da gruppi di broiler con scarse performances produttive, alcuni ceppi di IBDV con caratteristiche genetiche uniche, diverse da tutti gli altri ceppi presenti in *GenBank*. Il nuovo genotipo, denominato ITA, è piuttosto diffuso nel nostro paese (Lupini *et al.*, 2016). Il presente studio prevede la valutazione della patogenicità in polli SPF del genotipo ITA, dopo infezione sperimentale in condizioni d'isolamento biologico.

## **MATERIALI E METODI**

### *Piano sperimentale*

Sono stati utilizzati 65 polli SPF di 1 giorno di vita, alloggiati in isolatori per pollame

e numerati mediante anello al piede. Al 35° giorno di età, 40 animali (gruppo ITA) sono stati infettati per via orale con una dose di  $10^{4.5}$  EID<sub>50</sub> del ceppo 1829-01/12 (genotipo ITA); analogamente i restanti 25 soggetti (gruppo C-) sono stati inoculati con acqua sterile.

Gli animali sono stati quotidianamente osservati, dal primo al 15° giorno post-infezione, per valutazione della sintomatologia clinica. Prima dell'infezione sperimentale e successivamente ad intervalli settimanali, 10 soggetti per gruppo sono stati sottoposti a prelievi del sangue per esami sierologici, mediante ELISA per IBDV. Ai giorni 2, 4, 7, 14, 21 e 28 post-infezione (g.p.i.), cinque animali del gruppo ITA e tre del gruppo C- sono stati soppressi. Ciascun soggetto è stato pesato e sottoposto ad esame anatomopatologico e prelievo della borsa di Fabrizio per calcolo del

*Bursal index*. Dai soggetti soppressi, per la ricerca di IBDV tramite qRT-PCR, sono stati prelevati campioni di: borsa di Fabrizio, rene, fegato, milza, proventricolo, tonsille ciecali, timo, ghiandola di Harder e midollo osseo. Campioni di borsa di Fabrizio sono stati prelevati anche per esame istopatologico.

#### *Bursal index (BI)*

Tale indice è stato calcolato con la seguente formula: peso dell'organo/peso corporeo X1000, e fornisce un'indicazione del livello di compromissione dell'organo a seguito di infezione da IBDV.

#### *Istopatologia*

I tessuti sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. Quindi inclusi in paraffina, processati con metodi convenzionali, sezionati al microtomo e colorati con ematossilina ed eosina.

#### *Sierologia*

I sieri sono stati processati per rilevare la presenza di anticorpi per IBDV mediante kit ELISA del commercio (BioCheck (IBD) Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit).

#### *Estrazione RNA virale e qRT-PCR*

L'estrazione dell'RNA virale da organi è stata effettuata secondo Li *et al.* (1993), e ha previsto l'utilizzo di Solution D contenente Guanidina Tiocianato. Per l'evidenziazione e la quantificazione di IBDV è stata utilizzata una qRT-PCR, messa a punto presso la Sezione di Microbiologia e Malattie infettive del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli Studi di Padova. È stata utilizzata una curva standard creata correlando i valori di crossing point (Cp) di diluizioni di IBDV a titolo noto al Log della loro concentrazione iniziale. La quantificazione del campione è stata ottenuta per interpolazione del relativo valore di Cp sulla curva standard.

#### *Analisi statistica*

Per valutare le differenze fra gruppi sono stati applicati test statistici quali U di Mann Whitney o T di student. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $p$  value < 0,05.

## RISULTATI

In condizioni sperimentali gli animali del gruppo ITA non hanno mai mostrato mortalità o sintomatologia clinica. All'esame anatomopatologico, al 2° g.p.i., gli animali infettati mostravano una borsa di Fabrizio aumentata di volume, giallastra con presenza di edema gelatinoso sottosieroso (figura 1); erano inoltre presenti spruzzature emorragiche sulla superficie della coscia e della gamba (figura 2). Dal 4° g.p.i. fino al termine della prova (28° g.p.i.) era evidente atrofia della borsa di Fabrizio (figura 3), che presentava dimensioni visibilmente minori rispetto agli animali della stessa età, del gruppo controllo. I valori di *bursal index* (figura 4) confermano queste osservazioni, mostrando che dal 4° giorno post-infezione gli animali del gruppo ITA hanno valori medi di BI significativamente minori rispetto a quelli del gruppo di controllo ( $p < 0,005$ ). Le lesioni istopatologiche alla borsa di Fabrizio erano caratterizzate, progressivamente da edema, deplezione linfocitaria, formazioni cistiche e proliferazione del connettivo interfollicolare (figura 5).

La distribuzione e la quantificazione di IBDV nei tessuti esaminati, ottenute mediante qRT-PCR, sono riportate in tabella 1 ed in figura 6.

La borsa di Fabrizio è risultata sempre positiva fino al 28° g.p.i. con titoli virali anche di  $10^6$ /ml EID<sub>50</sub> (7° g.p.i.). Al termine della prova i titoli virali erano ancora di  $10^2$ /ml EID<sub>50</sub>.

Titoli superiori a  $10^4$ /ml EID<sub>50</sub> si sono rinvenuti, anche a livello di timo, tonsille cecali e milza.

L'andamento dei titoli anticorpali negli animali infetti è riportata in figura n. 7, tutti i soggetti infettati mostrano rialzo anticorpale a partire dal 7° g.p.i., con titoli crescenti fino al termine della prova.

## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

La mancanza di sintomatologia e mortalità osservata in polli SPF infettati sperimentalmente con IBDV genotipo ITA indica un andamento subclinico dell'infezione; l'atrofia della borsa di Fabrizio risulta essere precoce e prolungata fino al termine della prova. Anche se il genotipo ITA non è causa diretta di mortalità, il danno alla borsa di Fabrizio indotto, lascia presupporre una compromissione importante della risposta immunitaria. La patogenicità e la dinamica di distribuzione *in vivo* del genotipo ITA, definite in questo studio, sono più simili a quelle riportate per i ceppi *varianti* piuttosto che per i ceppi *classici subclinici*.

Il genotipo ITA mostra infatti una rapida e grave deplezione linfocitaria della borsa di Fabrizio ed un ritardato processo rigenerativo, caratteristiche queste tipiche dei ceppi *varianti* (Sharma et al., 1989; Palya et al., 2012).

L'importanza economica delle cosiddette *varianti* non è solo legata al loro potenziale immunosoppressivo ma anche alla frequente mancanza di cross-protezione nei loro confronti da parte dei vaccini IBDV convenzionali. Per questo motivo sarà importante verificare la protezione immunitaria conferita dai vaccini utilizzati nel nostro paese nei confronti di questo nuovo genotipo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Li J, Ling R, Randhawa JS, Shaw K, Davis PJ, Juhasz K, Pringle CR, Easton AJ and D Cavanagh D (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virus Research*, 41: 185-191.

2. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M, and E Catelli (2016). A Molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.* 25:1-22.
3. Palya V (2012). Determinants of Pathogenicity for Gumboro Virus and Epidemiology in Europe. *Gumboro Symposium: recent European experiences on IBD control*. Budapest (Hungary), 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> of January 2012.
4. Sharma JM, Dohms JE and AL Metz. (1989). Comparative Pathogenesis of Serotype 1 and Variant Serotype 1 Isolates of Infectious Bursal Disease Virus and Their Effect on Humoral and Cellular Immune Competence of Specific-Pathogen-Free Chickens. *Avian Dis.* 33: 112-124.

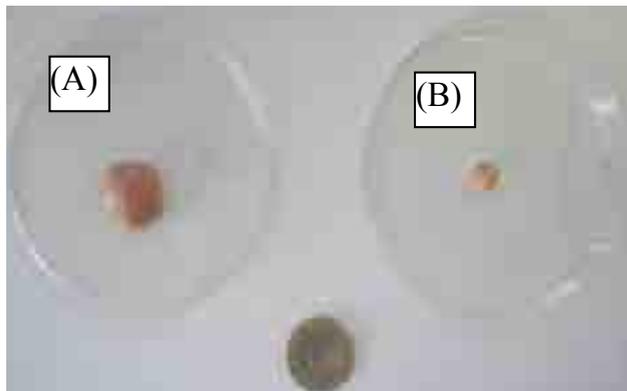
**Figura 1.** 2° giorno post-infezione. Gruppo ITA: Borsa di Fabrizio con edema sottosieroso.



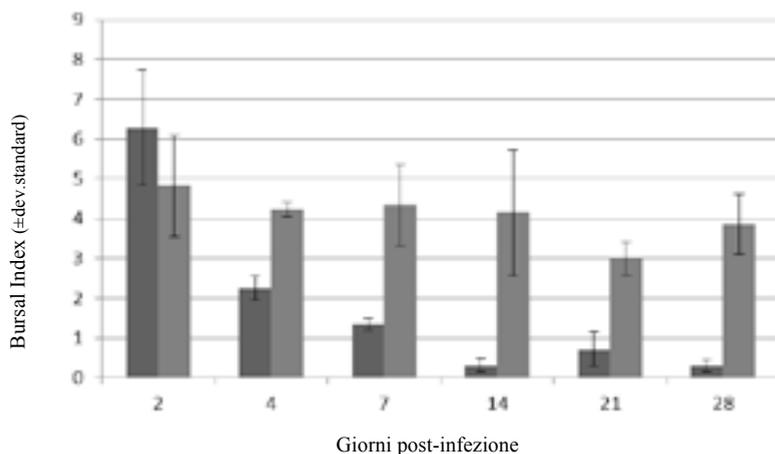
**Figura 2.** Gruppo ITA, 2° giorno post-infezione. Emorragie sottocutanee a livello degli arti inferiori.



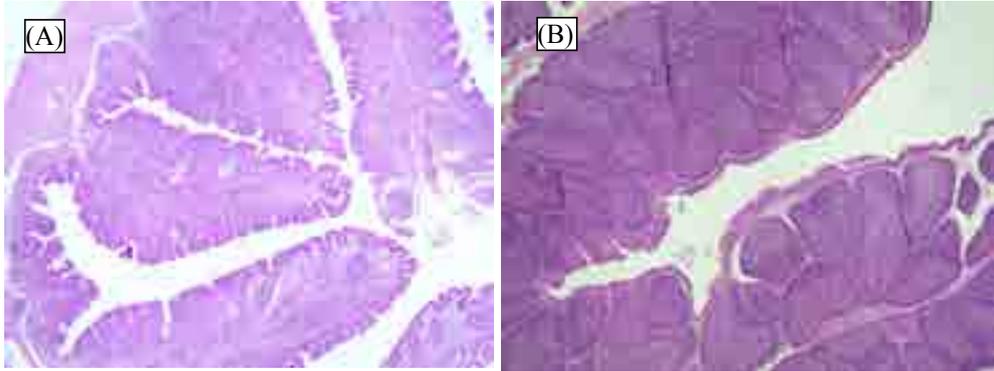
**Figura 3.** 28° giorno post infezione. (A) Gruppo C-: Borsa di Fabrizio di aspetto normale. (B) Gruppo ITA: Borsa di Fabrizio atrofica.



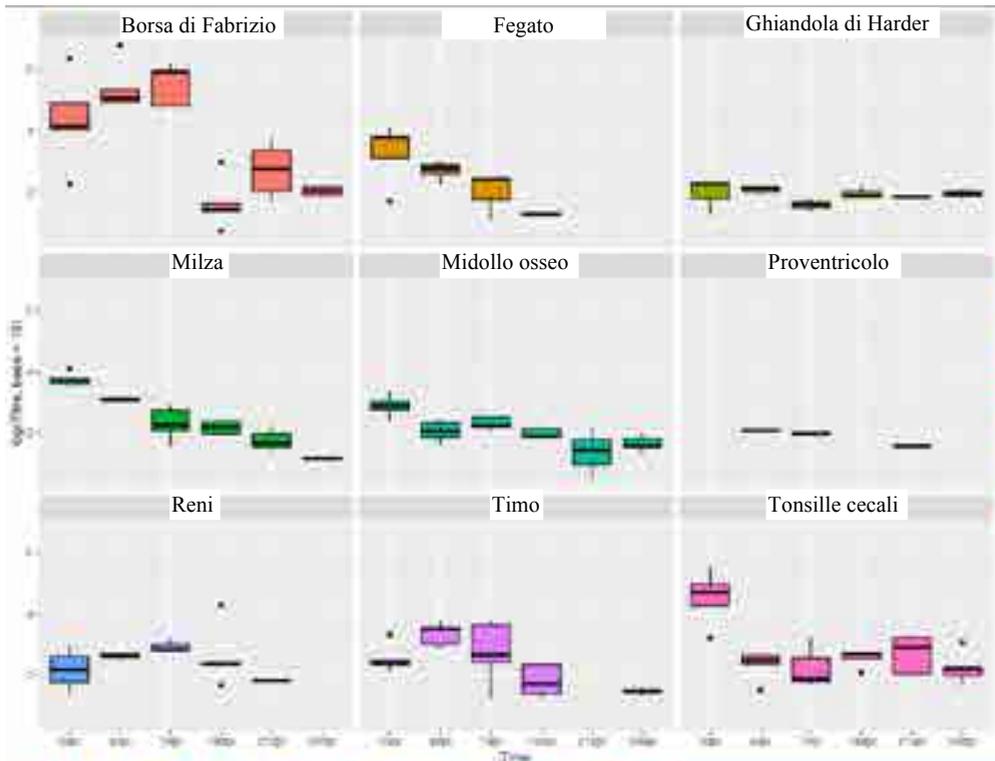
**Figura 4.** Media dei valori di Bursal Index nel gruppo ITA (grigio scuro) e nel gruppo C- (grigio chiaro). Dal 4°giorno post-infezione gli animali del gruppo ITA hanno valori medi significativamente minori rispetto a quelli del gruppo di controllo ( $p < 0,005$ ).



**Figura 5** Borsa di Fabrizio, 14° giorno post-infezione. (A) Gruppo ITA: atrofia delle pliche bursali, formazioni cistiche e proliferazione dello stroma interfollicolare fibroso. (B) Gruppo C-. follicoli di dimensioni e struttura normale per la età del soggetto esaminato (Ematossilin-eosina, 4X)



**Figura 6.** Box plot ottenuto dalla qRT-PCR per IBDV che mostra la concentrazione di RNA virale nei diversi tessuti.

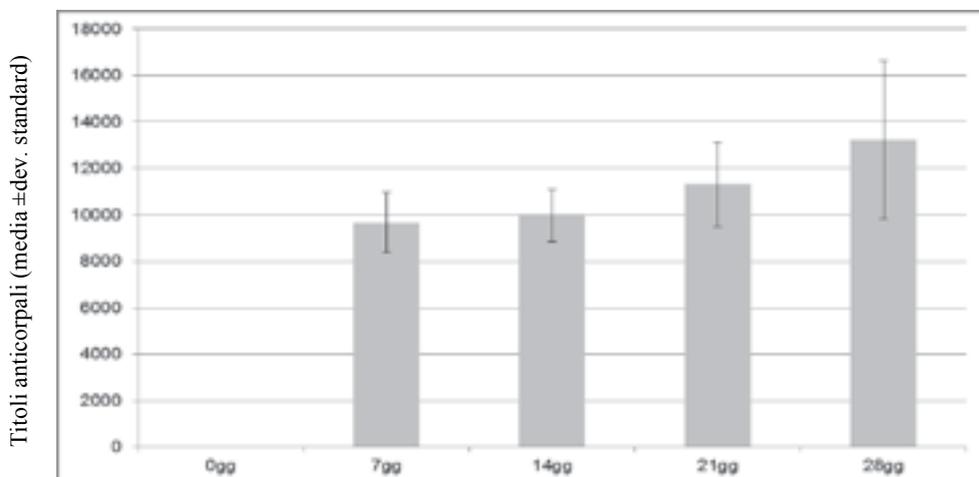


**Tabella 1.** Evidenziazione di IBDV nei tessuti esaminati

g.p.i	Borsa	Timo	Rene	Fegato	Milza	Pro-ventricolo	Tonsille cecali	Ghiandola di Harder	Midollo osseo
2	5/5*	5/5	2/5	5/5	5/5	0/5	4/5	3/5	5/5
4	5/5	5/5	4/5	4/5	3/3	1/5	5/5	3/5	5/5
7	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	1/5	2/5	2/5	5/5
14	5/5	5/5	5/5	1/5	4/5	0/5	4/5	3/5	5/5
21	5/5	0/5	1/5	0/5	3/5	1/5	5/5	1/5	2/5
28	4/5	2/5	0/5	0/5	1/5	0/5	5/5	3/5	4/5

\*numero di animali positivi/animali esaminati

**Figura 7.** Gruppo ITA: media dei titoli anticorpali ottenuti mediante Kit Elisa dopo infezione sperimentale.



## **CASI AVIARI INTERESSANTI DIAGNOSTICATI AL CALIFORNIA ANIMAL HEALTH AND FOOD SAFETY LABORATORY SYSTEM DI TULARE, NEL PERIODO MAGGIO-GIUGNO 2016**

### ***INTERESTING POULTRY CASES SEEN AT THE CALIFORNIA ANIMAL HEALTH AND FOOD SAFETY LABORATORY SYSTEM, TULARE LABORATORY, MAY AND JUNE 2016***

Mainenti M.<sup>1</sup>, Ochoa J.N.<sup>2</sup>, Rimoldi G.<sup>2</sup>, Adaska J.M.<sup>2</sup>, Vicenzoni G.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>3</sup>, Shivaprasad H.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTI-Struttura Complessa Territoriale di Verona e Vicenza, Via San Giacomo, 5, 37135 Verona (VR), Italy

<sup>2</sup> California Animal Health and Food Safety laboratory, CAHFS-Tulare Branch, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis. 18830 Road 112, Tulare, California 93274, USA.

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTI-Laboratorio di Medicina Aviare, Viale dell'università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy

#### **Summary**

The California Animal Health and Food Safety laboratory system (CAHFS) is the California's warning system for livestock and poultry diseases. Tulare laboratory is one of the four laboratories of the CAHFS which provides quality (quick, thorough and friendly) service to the clients by performing extensive laboratory tests that protects the animal health and production performance, public health and food safety. The aim of this presentation is to present the most interesting and frequently seen cases of avian diseases that were diagnosed during a two-month-training period at CAHFS - Tulare branch, May-June 2016. During this time period, more than 600 birds, mostly chickens and turkeys, comprising more than 80 cases were received and full necropsies were performed on all birds. Approximately 85% of the birds were from commercial poultry operations. Leg problems in broilers of 2-3 weeks of age and above and diarrhea in poult with increased mortality were the main reasons for submission. The most frequent diseases diagnosed in broiler chickens were reoviral arthritis, runting-stunting syndrome, transmissible viral proventriculitis and infectious laryngotracheitis. In commercial turkeys, poult enteritis mortality syndrome, reoviral myocarditis, rickets and one very unusual case of fowl cholera involving the keel bursa and hock joints but not the lungs were diagnosed. Three cases of histomonas typhlitis in 21 to 31 week-old commercial replacement broiler breeders were also diagnosed. Interestingly, there was no evidence of *Heterakis gallinarum* in the case of histomoniasis. One case of Marek's disease in commercial pullets was also diagnosed. Reoviral tenosynovitis and arthritis in broiler chickens has only been recently diagnosed in commercial flocks in the state of California, whereas infectious laryngotracheitis in broilers and fowl cholera in turkeys were common findings. Reoviruses were isolated from the tendons, sequenced and were shown to be different from the vaccine strain. Comparing these data with the necropsies performed at CAHFS in Tulare in the last few years, some of the diseases dia-

gnosed during this 2-month-period reflect the general trend of poultry diseases in California's farms in the last years. However, some other cases mentioned above represent rare diseases in commercial poultry, or emerging diseases, or showed atypical pathological presentation.

## **INTRODUZIONE**

Il California Animal Health and Food Safety Laboratory System (CAHFS) è la spina dorsale del sistema di sorveglianza dello Stato della California negli Stati Uniti d'America per le malattie degli animali da reddito e pollame. Lo scopo principale è quello di migliorare e proteggere la salute e la produttività degli animali da reddito, la salute pubblica e l'alimentazione animale, attraverso un servizio veloce, approfondito e allo stesso modo amichevole. Il servizio territoriale viene garantito attraverso una rete di 4 sedi distribuite lungo tutto lo Stato e grazie alla cooperazione con il California Department of Food and Agriculture (CDFA), University of California in Davis (UC Davis), veterinari liberi professionisti e produttori di animali da reddito e pollame. Il presente lavoro vuole condividere la casistica diagnostica di patologia aviaria raccolta durante un periodo di due mesi all'interno del laboratorio nella sede di Tulare.

## **MATERIALI E METODI**

Nel periodo maggio-giugno all'interno del CAHFS di Tulare sono stati sottoposti ad esame necroscopico più di 600 soggetti di specie aviaria, facenti parte di più di 80 casi diagnostici differenti. Circa l'85% degli animali ricevuti provengono da allevamenti di tipo intensivo, ed il totale dei casi diagnostici si suddividono per il 40% in polli broilers (di cui il 45% attraverso il piano di monitoraggio nazionale), il 18% polli rurali, il 18% tacchini commerciali da carne, 15% altre specie aviarie non destinate al consumo umano, 5% polli riproduttori, 1% pollastre commerciali.

In tutti i casi ricevuti, in sede necroscopica in congiunta all'esame anatomopatologico macroscopico, sono stati effettuati di routine campionamenti per l'esame istopatologico, batteriologico, ricerca *Salmonella spp.*, sierologica e di biologia molecolare per influenza aviaria. Altri esami aggiuntivi effettuati a seconda del sospetto diagnostico sono stati: esame di immunofluorescenza, di biologia molecolare, di microscopia elettronica, di isolamento virale, immunoistochimico e tossicologico.

## **RISULTATI**

Per quanto riguarda i polli broiler, la casistica si divide tra animali con sintomatologia clinica conclamata (circa il 60%), e animali sottoposti a necroscopia per il piano di monitoraggio nazionale NPIP (National Poultry Improvement Plan) (circa il 40%). All'interno dei primi, la maggior parte dei casi è stata inviata al laboratorio per presenza di problemi articolari clinicamente evidenti a partire da 2-3 settimane di età (circa il 70%), seguita da gruppi con sintomatologia respiratoria dai 28 ai 45 giorni di età (20%) e soggetti con problemi enterici di 16 e 31 giorni d'età (10%). In questi casi le malattie più frequentemente diagnosticate sono state: artrite da reovirus, laringotracheite infettiva, bronchite infettiva ed enterite necrotica. Gli animali facenti parte del piano di monitoraggio nazionale erano generalmente asintomatici e di età compresa tra i 20 e 38 giorni. Tra questi sono state diagnosticate più comunemente: enterite virale, proventricolite virale trasmissibile, coccidiosi e criptosporidiosi. Per quanto riguarda i tacchini commerciali, il 58% dei casi è rappresentato da tacchi-

notte di 1-3 settimane di età con problemi enterici, il 26% da tacchinotti di un giorno con letargia e mortalità elevata rispetto a quella attesa, il 17% per problemi osteoarticolari a 18-20 settimane di età. Le malattie diagnosticate sono state rispettivamente: complesso dell'enterite del tacchinotto, miocardite da reovirus, onfalite batterica, rachitismo, e colera aviario associato a bursite sternale e artrite fibrino-necrotico-emorragiche.

Alcune malattie considerate rare negli allevamenti commerciali sono state inoltre diagnosticate durante lo stesso periodo: istomoniasi in 3 gruppi di polli riproduttori di 21-31 settimane d'età provenienti da due allevamenti dello stesso produttore con tiflite fibrino-necrotica in assenza di epatite e di *Heterakis gallinarum* negli animali affetti, e malattia di Marek in un gruppo di pollastre commerciali di 16 settimane di età con sintomatologia neurologica, zoppia e paralisi degli arti.

## DISCUSSIONE

La casistica riportata in questo studio effettuato in maggio e giugno 2016 rappresenta solo in parte la situazione mediamente riscontrata dal laboratorio CAHFS di Tulare negli anni recenti. Comparando questi dati con le necropsie effettuate negli ultimi anni, alcune delle malattie diagnosticate in questo periodo rappresentano malattie frequentemente presenti negli allevamenti della California, quali: complesso dell'enterite del pollo e del tacchinotto, proventricolite virale trasmissibile, miocardite da reovirus nel tacchino, onfalite, laringotracheite infettiva, bronchite infettiva, rachitismo, colera aviario ed enterite necrotica. Tuttavia durante questo periodo si sono riscontrati anche casi di malattie rare in allevamenti commerciali, emergenti o presentazioni inusuali di malattie comuni.

L'elevato numero di casi di artrite e tenosinovite sostenuta da reovirus in maggio e giugno sottolinea come il ruolo patogeno di questo virus nel pollo broiler sia una problematica che si sta diffondendo solo molto recentemente in California. Il suo isolamento e sequenziamento dai tendini affetti mostrano inoltre che i ceppi coinvolti sono diversi da quelli vaccinali utilizzati in questo Stato.

A differenza della regolamentazione italiana, la laringotracheite infettiva ed il colera aviario in California non sono soggette a misure di controllo, ed esse sono infatti tra le malattie più frequenti negli allevamenti commerciali rispettivamente di broiler e tacchini in questo Stato. Tuttavia nel caso di colera aviario in tacchini da carne di questo studio, la malattia si è presentata con caratteristiche inusuali, con il coinvolgimento prevalente delle articolazioni e borsa sternale anziché dell'apparato respiratorio.

L'istomoniasi è una malattia piuttosto frequente negli allevamenti di tacchino da carne e rara nel pollo, principalmente nei polli rurali. Il caso descritto in questo lavoro rappresenta solo il secondo caso di istomoniasi in polli di allevamento intensivo diagnosticato dall'intero sistema CAHFS. Sebbene *Histomonas meleagridis* necessita dell'ospite intermedio *Heterakis gallinarum*, esso non è stato evidenziato negli animali affetti presentati in questo studio e la modalità di trasmissione all'interno dell'allevamento è ancora sotto valutazione. Un altro caso raramente riscontrato è la diagnosi di malattia di Marek in allevamenti commerciali, probabilmente attribuibile ad una non corretta pratica di vaccinazione.

## CONCLUSIONI

Durante un periodo di due mesi all'interno del laboratorio CAHFS di Tulare sono

state riscontrate alcune delle malattie più comunemente presenti negli allevamenti della California quali sindrome da malassorbimento, complesso dell'enterite del tacchinotto, proventricolite virale, miocardite da reovirus nel tacchino, onfalite da *E. coli*, laringotracheite infettiva, bronchite infettiva, rachitismo, colera aviare ed enterite necrotica. Tuttavia anche malattie rare negli allevamenti commerciali, malattie emergenti o presentazioni inusuali di malattie frequenti sono state diagnosticate, quali artrite da reovirus, istomoniasi in polli riproduttori, Marek in pollastre commerciali, colera aviare con coinvolgimento prevalentemente articolare e sternale.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Dolka B, Zbikowski A, Dolka I, Szeleszczuk P. (2015). Histomonosis - an existing problem in chicken flocks in Poland. *Vet. Res. Commun.* 39:189-195.
- Glisson GR, Hofacre CL, Christensen JP. (2013). Fowl Cholera. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, NairV (Eds.), *Diseases of Poultry 13th ed.*, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 807-823.
- Guy JS, West MA, Fuller FJ, Marusak RA, Shivaprasad HL, Davis JL, Fletcher OJ. (2011). Detection of chicken proventricular necrosis virus (R11/3 virus) in experimental and naturally occurring cases of transmissible viral proventriculitis with the use of a reverse transcriptase-PCR procedure. *Avian Dis.* 55(1):70-5.
- Hess M, McDougald LR. (2013). Histomoniasis (Blackhead) and other protozoan diseases of the intestinal tract. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, NairV (Eds.), *Diseases of Poultry 13th ed.*, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 1172-1179.
- Jones RC. (2013). Reovirus infections. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, NairV (Eds.), *Diseases of Poultry 13th ed.*, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 351-366.
- Noiva R, Guy JS, Hauck R, Shivaprasad HL. (2015). Runting Stunting Syndrome Associated with Transmissible Viral Proventriculitis in Broiler Chickens. *Avian Dis.* 59(3):384-7.
- Schat KA, Nair V. (2013). Marek's disease. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, NairV (Eds.), *Diseases of Poultry 13th ed.*, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 515-552.
- Shivaprasad HL, Franca M, Woolcock PR, Nordhausen R, Day JM, Pantin-Jackwood M. (2009). Myocarditis associated with reovirus in turkey poults. *Avian Dis.* 53(4):523-32.
- NPIP: <http://cpif.org/national-poultry-improvement-plan-npip>

## **RUOLO DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NELLA PERSISTENZA DI *SALMONELLA GALLINARUM* IN ALLEVAMENTO**

Marino M.<sup>1</sup>, Pugliese N.<sup>1</sup>, Circella E.<sup>1</sup>, Cocciolo G.<sup>1</sup>, De Virgilio C.<sup>2</sup>, Romito D.<sup>1</sup>, D'Onghia F.<sup>1</sup>, Camarda A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S.p. per Casamassima km 3, 70010, Valenzano (Ba).*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Via E. Orabona, 4, 70124 Bari.*

### **Summary**

The aim of the study was to assess the role played by *Dermanyssus gallinae* in the diffusion of *Salmonella enterica* ser. Gallinarum in intensive poultry farms. The investigation was carried out in a laying hen farm, infested by *D. gallinae*, during an outbreak of fowl typhoid. Mites were collected along two subsequent productive cycles and during the sanitary break. Mites were harvested from 12 different positions in the shed and overall 14 samplings were performed. DNA extraction was carried out from each aliquot and the presence and quantification of *S. Gallinarum* was assessed by using a Seminested-PCR protocol previously validated and Real Time PCR, both proved to be highly specific and sensitive. Results highlighted that, during the outbreak, *S. Gallinarum* was constantly present in mites, as all sampling resulted positive. Similarly, one sample collected during the sanitary break was positive by snPCR, despite the shed had been washed and disinfected. The samples of *D. gallinae* from the second productive cycle were positive as well. However, fowl typhoid was not observed among the animals, probably due to prophylactic measures which comprehended an enhanced vaccination program. These data strongly suggest that *D. gallinae* may act as vector and reservoir of *S. Gallinarum*, thus contributing to the spread of the pathogen between subsequent productive cycles.

### **INTRODUZIONE**

L'acaro rosso del pollame, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778), è il più diffuso ectoparassita del pollame, in Europa (George *et al.*, 2015) ed in molti paesi extra-europei (Wang *et al.*, 2010, Sparagano *et al.*, 2009 Roy and Buronfosse, 2011). La presenza del *D. gallinae* negli allevamenti può avere gravi ripercussioni sulla salute e la produttività degli animali. Nei gruppi infestati si osservano fenomeni di cannibalismo, una diminuzione del tasso di crescita degli animali e perfino un aumento della mortalità in caso di massiva infestazione (Sparagano *et al.*, 2014). Si possono evidenziare, inoltre, gravi ripercussioni sulla qualità delle uova, con riduzione dello spessore del guscio, e calo del peso. Nel complesso, l'infestazione, pertanto, ha un significativo impatto economico per gli allevatori, ulteriormente aggravato dai costi da sostenere per attuare i trattamenti e le misure di controllo contro la diffusione incontrollata degli acari (Sparagano *et al.*, 2009).

All'azione esercitata direttamente dall'acaro, aggiunge il potenziale ruolo di vettore che *Dermanyssus gallinae* può rivestire nella trasmissione di alcuni agenti patogeni (Valiente Moro *et al.*, 2005), sia batterici che virali, come Newcastle disease virus, *Pasteurella multocida*, *Coxiella burnetii*, *Listeria Monocytogenes* (Valiente Moro

*et al.*, 2009), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Chirico *et al.*, 2003) and *Chlamydia psittaci* (Circella *et al.*, 2011).

Valiente Moro *et al.* (2007b) hanno anche evidenziato che l'acaro può trasmettere *Salmonella* Enteritidis, se assunto per via orale dal pulcino.

*S. enterica* supsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*), invece, sembra sopravvivere all'interno di *D. gallinae* fino a quattro mesi (Zeman *et al.*, 1982).

*S. Gallinarum* è l'agente etiologico della tifosi aviare, una malattia setticemica acuta o cronica, che generalmente colpisce galline adulte ed altri uccelli (Shivaprasad and Barrow, 2008; Barrow and Neto, 2011). È una malattia diffusa in tutto il mondo (Shivaprasad and Barrow, 2008), caratterizzata da alta morbilità e mortalità in fase acuta o subacuta (Davies, 2012). La tifosi aviare è stata dichiarata eradicata nella maggior parte delle nazioni occidentali (Davies, 2012), ma diversi focolai si registrano ancora lungo il bacino del Mar Mediterraneo e nelle nazioni in cui le misure di controllo sono poco efficienti e le condizioni ambientali ne favoriscono la diffusione (Barrow and Neto, 2011). Il controllo della malattia è ulteriormente complicato dalla modalità di trasmissione del batterio, che può avvenire sia per via verticale che orizzontale (Paiva *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 1996), ed anche a causa della contaminazione della lettiera e dell'acqua di bevanda (Shivaprasad and Barrow, 2008). L'eliminazione del germe dall'allevamento è particolarmente difficile in quanto il patogeno sembra permanere nell'allevamento anche durante il periodo di vuoto sanitario. Questo potrebbe essere legato ad alcuni fattori, biotici o abiotici che potrebbero fungere da *reservoir* di infezione. Non è ben chiaro se *D. gallinae* possa effettivamente giocare tale ruolo. Infatti, se è vero che, come precedentemente riportato, la sopravvivenza *in vitro* di *S. Gallinarum* in associazione con *D. gallinae* è stata accertata (Zeman *et al.*, 1982), non sono ancora disponibili dati che confermino tale condizione in campo.

Il presente lavoro è stato pertanto finalizzato a verificare in allevamento se in corso di focolaio di Tifosi aviare, *D. gallinae* possa favorire la persistenza e la diffusione del germe tra due diversi cicli produttivi.

## MATERIALI E METODI

### *Descrizione dell'allevamento e del focolaio*

Le analisi sono state condotte in un periodo compreso tra gennaio 2013 e novembre 2014 in un allevamento industriale per la produzione di uova da consumo della Puglia. Quando lo studio è stato avviato, nell'allevamento era in corso un focolaio di tifosi aviare, che ha fatto registrare una mortalità media del 22%. Contemporaneamente, in azienda era presente una massiva infestazione da *D. gallinae*. Considerata la gravità della malattia e le difficoltà connesse con il suo controllo, l'allevatore allontanava gli animali a 10 mesi di deposizione, durante la terza settimana di agosto 2013 ed istituiva un periodo di vuoto sanitario di 60 giorni prima di provvedere all'accasamento del gruppo successivo.

La rimonta è stata effettuata con un gruppo di 22.000 ovaiole, ibrido Hy-line.

Il gruppo, fino all'età di 120 giorni è stato allevato in una pulcinaia negativa per *S. Gallinarum*, la quale non aveva alcun contatto né di personale né di attrezzature con quello di destinazione. Gli animali sono stati sottoposti a vaccinazione con Bio-Vac SGP695 a 30, 60 e 90 giorni di vita prima dell'accasamento e monitorati per la presenza di *S. Gallinarum* prima di essere trasportate nell'allevamento di destinazione.

### *Campionamento*

Gli acari sono stati raccolti durante il focolaio di malattia, il vuoto sanitario e durante il ciclo di produzione successivo, ad intervalli di tempo medi di 45 giorni. Per raccogliere gli acari sono state utilizzate trappole di cartone (Mul *et al.*, 2009) posizionate a vari livelli in almeno 12 punti del capannone (3 per ogni fila). Le trappole sono state poste sulla gabbia e lasciate in situ per 7 giorni prima di essere rimosse. In totale sono stati realizzati 14 campionamenti. Gli acari recuperati dalle trappole, dopo ciascun campionamento sono stati unificati. Da ciascun gruppo sono state allestite 2 aliquote da cento acari ciascuna da sottoporre agli esami molecolari come di seguito riportato.

### *Estrazione di DNA e seminested PCR*

A partire da due aliquote per campionamento, il DNA totale è stato estratto mediante kit commerciale PureLink Genomic DNA Kit (Life Technologies, Milano), ed il DNA ottenuto è stato quantificato mediante misurazione della densità ottica a 260 nm.

La rilevazione di *S. Gallinarum* dai campioni di *D. gallinae* è stata condotta mediante Seminested-PCR (snPCR) come descritto da Pugliese *et al.* (2011). I prodotti dei cicli di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

### *Real Time PCR*

La quantità di DNA di *S. Gallinarum* presente negli estratti da acari è stata determinata mediante Real Time PCR (qPCR).

I primer sono stati disegnati sulla base di una regione unica e non ripetuta caratterizzante il genoma di *S. Gallinarum* (Thomson *et al.*, 2008), e precedentemente riconosciuta essere specifica e discriminante (Pugliese *et al.*, 2011). 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. Ciascuna reazione è stata condotta in triplicato e per ogni esperimento sono state allestite tre reazioni con acqua distillata da usare come controllo negativo.

Tutte le reazioni sono state condotte su piattaforma ABI 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, Milano). I dati sono stati poi analizzati con il Sequence Detection Software versione 1.2.3 (Life Technologies), con l'impostazione automatica del ciclo soglia (Ct). Per la costruzione della retta di taratura, è stato utilizzata un'aliquota di DNA estratto da coltura pura di *S. Gallinarum* come sopra descritto, che, a sua volta è stato diluito per avere sette concentrazioni scalari.

La quantità relativa di DNA di *S. Gallinarum* presente in ciascun campione è stata determinata mediante il rapporto tra media delle quantità di DNA di *S. Gallinarum* e la quantità di DNA totale.

## **RISULTATI**

In tabella 1 sono riepilogati la quantità relativa di DNA di *S. Gallinarum* (rqSGD) per campione ed i risultati delle snPCR, in relazione alla situazione dell'allevamento.

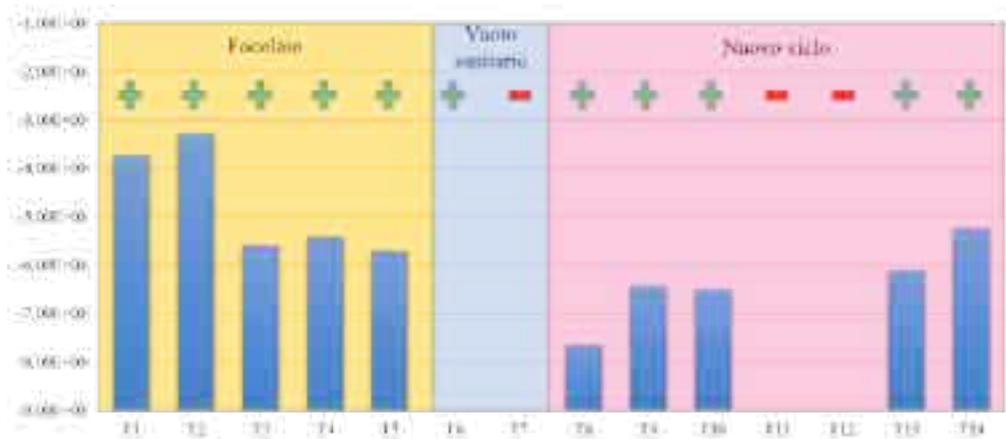
**Tabella 1.** Presenza e quantità relativa di DNA di *S. Gallinarum* nei campioni di acaro.

Tempo	rqSGD	Log <sub>10</sub> (rqSGD)	SN-PCR	Situazione dell'allevamento
T <sub>1</sub>	1,88E-04	-3,73E+00	Positivo	Focolaio
T <sub>2</sub>	5,26E-04	-3,28E+00	Positivo	
T <sub>3</sub>	2,59E-06	-5,59E+00	Positivo	
T <sub>4</sub>	3,93E-06	-5,41E+00	Positivo	
T <sub>5</sub>	2,01E-06	-5,70E+00	Positivo	
T <sub>6</sub>	Non rilevabile	/	Positivo	Vuoto sanitario
T <sub>7</sub>	Non rilevabile	/	Negativo	
T <sub>8</sub>	2,28E-08	-7,64E+00	Positivo	Accasamento e nuovo ciclo
T <sub>9</sub>	3,81E-07	-6,42E+00	Positivo	
T <sub>10</sub>	3,23E-07	-6,49E+00	Positivo	
T <sub>11</sub>	Non rilevabile	/	Negativo	
T <sub>12</sub>	Non rilevabile	/	Negativo	
T <sub>13</sub>	7,86E-07	-6,10E+00	Positivo	
T <sub>14</sub>	5,77E-06	-5,24E+00	Positivo	

Il DNA di *S. Gallinarum* è stato riscontrato negli acari di quasi tutti i campioni analizzati. Le due metodiche impiegate hanno fornito risultati sovrapponibili ad eccezione del campionamento a T<sub>6</sub> in cui la snPCR rivelava una positività che invece non era confermata dalla qPCR.

La Fig. 1 mostra l'andamento della rqSGD nel corso del tempo. Durante la fase acuta del focolaio (T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>) la rqSGD è stata di circa due ordini di grandezza (10<sup>-4</sup>) più alta, rispetto alla fase avanzata (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>). Il DNA di *S. Gallinarum* non è stato invece quantificabile durante il vuoto sanitario, anche se la snPCR condotta sul campione prelevato a T<sub>6</sub> ha dato esito positivo. Valori bassi ma rilevabili di DNA di *S. Gallinarum* sono stati determinati a partire dai campioni di acaro raccolti nei primi mesi del nuovo ciclo produttivo (T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub> e T<sub>10</sub>). Al contrario, le qPCR e le snPCR condotte sui campioni prelevati a T<sub>11</sub> e T<sub>12</sub> sono risultate entrambe negative, per poi tornare ad essere tutte positive a T<sub>13</sub> e T<sub>14</sub>, con una rqSGD compresa tra 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-6</sup>.

Nessun sintomo clinico e mortalità riconducibili a Tifosi aviare sono stati osservati sulle ovaiole dopo la rimonta.



**Figura 1.** Grafico del Log<sub>10</sub> delle concentrazioni medie di *S. Gallinarum* ai diversi tempi di prelievo. I segni positivo e negativo indicano, rispettivamente, la positività o negatività dei campioni a *S. Gallinarum* ottenuta mediante Seminested-PCR.

## DISCUSSIONE

I dati ottenuti confermano che *S. Gallinarum* può infettare *D. gallinae*. Infatti, il DNA del germe si ritrova associato all'acaro durante il focolaio d'infezione, durante il successivo vuoto sanitario e nel nuovo ciclo produttivo. È possibile ipotizzare che la quantità di *S. Gallinarum* associata all'acaro sia direttamente correlata con il livello di circolazione del batterio nell'allevamento. La rqSGD è maggiore durante la fase acuta del focolaio per poi calare successivamente, quando la malattia tende a divenire endemica.

Particolarmente interessanti sono i dati ottenuti durante il vuoto sanitario. Infatti, alcune aliquote di acari hanno dato esito positivo in snPCR e negativo in qPCR, probabilmente a causa della maggiore sensibilità della prima rispetto alla seconda (Bastien *et al.*, 2008).

Il dati che scaturiscono dal questo lavoro dimostrano che *D. gallinae* può infettarsi con *S. Gallinarum*, e consentire la persistenza della stessa all'interno della popolazione di artropodi ed in allevamento per l'intera durata del ciclo di produzione.

Sugli acari *Salmonella* sopravvive durante il vuoto sanitario, quando in allevamento sono effettuate stringenti azioni di pulizia, disinfezione e disinfestazione delle gabbie e degli ambienti. Nella prova oggetto di questo lavoro, *D. gallinae*, durante il vuoto sanitario erano nascosti nei posatoi, dove potevano sfuggire all'azione dei trattamenti operati durante le fasi di pulizia. È noto che l'acaro si nasconde negli anfratti e nelle crepe dei pavimenti e dei muri tra un ciclo produttivo e l'altro (Sparagano *et al.*, 2014). La sopravvivenza di acari infetti può ovviamente consentire il mantenimento dell'infezione nell'ambiente e garantire il passaggio sugli animali, che in condizioni predisponenti potrebbero tornare a presentare la malattia.

Nella prova effettuata, successivamente all'accasamento del nuovo gruppo di ovaiole la rqSGD rileva un aumento della quantità di DNA nella popolazione di acari. È plausibile pensare che esso sia riconducibile ad una ripresa della circolazione del germe all'interno del gruppo di animali.

Non è escluso, inoltre, che *Salmonella* possa moltiplicarsi all'interno degli acari, come ipotizzato da Valiente Moro *et al.* (2007a) per *Salmonella* Enteritidis. Ovviamente, per accertare il ruolo di serbatoio di *D. gallinae* sono necessari ulteriori approfondimenti.

Interventi straordinari di profilassi vaccinale nei confronti di *S. gallinarum* (dati non riportati) hanno probabilmente contribuito a T<sub>11</sub> e T<sub>12</sub> a ridurre la circolazione del germe a livelli non rilevabili dalla snPCR e qPCR. La carica di *S. Gallinarum* è comunque di nuovo aumentata via via che il ciclo produttivo volgeva verso la parte finale.

Nel complesso, i dati ottenuti da questo trial di campo dimostrano il ruolo di vettore giocato di *D. gallinae* durante il ciclo di produzione, e la stretta associazione che vi è tra acaro e *Salmonella* Gallinarum.

In un quadro più generale, il controllo e soprattutto l'eradicazione delle popolazioni di *Dermanyssus* dagli allevamenti devono rappresentare un obiettivo primario nella strategia di protezione degli animali non solo ai fini del contenimento delle perdite economiche indotte dall'acaro, ma anche per il controllo della diffusione delle malattie infettive all'interno dei gruppi in attività.

## CONCLUSIONI

Il potenziale ruolo di *D. gallinae* come vettore e *reservoir* di *S. Gallinarum*, è un problema di notevole importanza. Alla luce dei risultati ottenuti, l'acaro rosso sembra contribuire in modo decisivo alla perpetuazione della Tifosi all'interno dell'allevamento tra un ciclo produttivo e l'altro e garantire la persistenza del germe all'interno del ciclo produttivo.

La messa a punto di strategie di profilassi diretta ed indiretta volte al contenimento contestuale dell'infezione e dell'infestazione rappresentano un momento imprescindibile nella lotta contro la Tifosi aviare.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barrow PA and Freitas Neto OC. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review, *Avian Pathology*, 40:1, 1-13.
2. Bastien P, Procop GW and Reischl U. (2008). Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46:1897- 1900.
3. Chirico J, Eriksson H, Fossum O and Jansson D. (2003). The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 232-234.
4. Circella E, Pugliese N, Todisco G, Cafiero MA, Sparagano OAE and Camarda A. (2011). *Chlamydia psittaci* infection in canaries heavily infested by *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology*, 55, 329-338.
5. Cox NA, Bailey JS and Berrang ME. (1996). Extent of *Salmonellae* contamination in breeder hatcheries, *Poultry Science*, Champaign, 70: 416-418.
6. Davies R. (2012). Fowl Typhoid and Pullorum Disease, OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012, Chapter 2 .3 .11. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris.
7. George DR, Finn RD, Graham KM, Mul MF, Maurer V, Valiente Moro CV and Sparagano, OAE. (2015). Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? *Parasites & Vectors*, 8, 178.

8. Mul M, Van Niekerk T, Chirico J, Maurer V, O. Kilpinen O, Sparagano O, Thind B, Zoons J, Moore D, Bell B, Gjevre AG and Chauve C. (2009). Control methods for *Dermanyssus gallinae* in systems of laying hens. Results of an international seminar. *World Poult Sci J* 65:589–598.
9. Paiva, JB, Penha F, Anguello YMS, Siva MD, Gardin Y, Resende F, Berchieri A and Sestsi L. (2009). Efficacy 25 of several *Salmonella* vaccination programme against experimental challenge with *Salmonella* Gallinarum in commercial brown breeder hens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11(1): 65-72.
10. 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.
11. Roy L and Buronfosse T. (2011). Using mitochondrial and nuclear sequence data for disentangling population structure in complex pest species: a case study with *Dermanyssus gallinae*. *Plos One*, 6, e22305.
12. Shivaprasad HL and Barrow PA. (2008). Pullorum disease and fowl typhoid. In Y.M Saif, A.M. Fadly, J.R Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan & D.E Swayne (Eds.). *Diseases of Poultry* 12th edn (pp. 620\_634). Ames: Iowa State Press.
13. Sparagano O, Pavličević A, Murano T, Camarda A, Sahibi H, Kilpinen O, Mul M, van Emous, R, le Bouquin S, Hoel K and Cafiero MA. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Experimental and Applied Acarology*, 48, 3-10.
14. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ and Giangaspero A. (2014). Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annual Review of Entomology*, 59, 447-466.
15. 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.
16. Valiente Moro C, Chauve C and Zenner L. (2005). Vectorial role of some dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea). *Parasite*, 12, 99-109.
17. Valiente Moro C, Chauve C, Zenner L. (2007a). Experimental infection of *Salmonella enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet Parasitol* 146:329–336.
18. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OAE and Zenner L. (2009b). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Experimental and Applied Acarology*, 48, 93-104.
19. Wang FF, Wang M, Xu FR, Liang DM and Pan BL. (2010). Survey of prevalence and control of ectoparasites in caged poultry in China. *Veterinary Record*, 167, 934-937.
20. Zeman P, Štika V, Skalka B, Bártík M, Dusbábek F and Lávičková M. (1982). Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullorosis-typhus in hens. *Folia Parasitologica*, 29, 371-374.

## EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK IN ITALIA NEL 2014-2016

Mescolini G.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Bellinati L.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>2</sup>, Rossi G.<sup>3</sup>, Pesente P.<sup>3</sup>, Cecchinato M.<sup>4</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> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì, Via don Eugenio Servadei 3/E-3/F, 47122, Forlì (FC), Italia.

<sup>3</sup> Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5, 37132, San Michele Extra (VR), Italia

<sup>4</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Agripolis Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD) - Italia.

### Summary

Eighteen Marek's disease virus (MDV-1) strains collected from clinical cases of Marek's disease occurred from 2014 to 2016 in Italian commercial and backyard chicken flocks, were analyzed. Viruses were detected by a PCR protocol targeting the *meq* gene from feathers, spleen or tumor samples of birds affected by classical nervous or acute forms. Nucleotide and amino acid sequences obtained, were compared with complete homologous sequences of selected MDV-1 strains with different degrees of pathogenicity retrieved from *GenBank*. Phylogenetic analysis of *meq* genes was performed.

All the eight strains from vaccinated commercial flocks and two from unvaccinated backyard chickens, affected all by acute form, clustered together and with published Polish strains isolated in the last decade. Their sequences may be ascribed to virulent and very virulent MDVs. Eight out of ten strains from unvaccinated backyard chickens with classical form were closely related to mild and attenuated ones.

In conclusion high virulence MDVs seems to circulate mostly in Italian commercial compartment where vaccination is routinely applied, while the rural sector is still affected by mild viruses probably due to the absent or lower vaccine pressure.

### INTRODUZIONE

Il virus della malattia di Marek o *Gallid alphaherpesvirus 2* è un herpesvirus appartenente alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, genere *Mardivirus*, responsabile nel pollo di una patologia a carattere linfoproliferativo. La malattia può manifestarsi con differenti forme patologiche dipendentemente dalla virulenza del ceppo virale, dalle vaccinazioni eseguite e dalla genetica dell'animale. Le due forme patologiche più rilevanti sono quella classica con sintomatologia neurologica e quella acuta caratterizzata da linfomi viscerali multipli. L'infezione avviene per via aerogena, il virus è linfotropo e replica principalmente nei linfociti T che rappresentano il mezzo di diffusione del virus nell'organismo e gli consentono di raggiungere l'epitelio dei follicoli delle penne. A questo livello avviene l'infezione interamente produttiva, con eliminazione nell'ambiente di virioni completi ed infettanti, mediante desquamazione (Calneck *et al.*, 1970). Nell'ambiente il virus rimane potenzialmente infettante per 4-8 mesi nei residui della desquamazione cutanea, nella lettiera e nella polvere ambientale (Witter *et al.*, 1968).

Il virus riconosce diversi patotipi denominati *mild*, *virulent*, *very virulent*, *very virulent plus* (Schat e Nair, 2008).

La malattia in Italia è stata segnalata negli ultimi anni sia nel settore industriale (Piccirillo, 2011; Camarda e di Pineto, 2012) che in quello rurale (Mescolini *et al.*, 2015).

Nel contesto industriale i focolai sono sporadici e generalmente si manifestano nella forma acuta, nonostante venga eseguita sistematicamente la vaccinazione di tutti i soggetti in incubatoio o *in ovo*, al 18° giorno di incubazione, oppure al primo giorno di vita. Negli allevamenti rurali invece, dove la vaccinazione non viene sempre impiegata, sono state rilevate sia la forma acuta viscerale sia quella classica nervosa.

A tutt'oggi i dati relativi alla caratterizzazione molecolare dei ceppi MDV-1 circolanti in Italia sono carenti. Scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare dal punto di vista molecolare ceppi virali evidenziati sia in ambito industriale sia in contesto rurale.

## MATERIALI E METODI

### Campioni biologici

Nel periodo compreso tra ottobre 2014 e aprile 2016, 18 campioni biologici di diversa tipologia sono stati prelevati da 8 allevamenti industriali e 10 rurali. La natura del campione, la provenienza, la tipologia di allevamento e i segni clinici o le lesioni anatomopatologiche osservate sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1.** Provenienza, tipologia di allevamento, sintomi/lesioni evidenziate e tipo di campioni analizzati.

Nome ceppo	Provenienza	Animali	Sintomi/lesioni	Campione
419-15	Emilia Romagna	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
456-15	Emilia Romagna	Industriali (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Penne
487-15	Piemonte (Cuneo)	Rurali (razze ornamentali)	Neoplasie viscerali	Penne
498-15	Emilia Romagna	Industriali (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Penne
507-15	Sardegna	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
509-15	Lazio (Roma)	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
510-15	Lazio (Roma)	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
513-15	Emilia Romagna	Industriale (ovaiole)	Neoplasie viscerali	Milza
515-15	Emilia Romagna	Industriale (ovaiole)	Neoplasie viscerali	Neoplasia ovarica
559-15	Veneto	Industriale (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Milza
561-15	Friuli	Industriale (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Milza
562-15	Lazio	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
565-15	Veneto	Industriale (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Milza
567-15	Emilia Romagna	Industriale (galletti)	Neoplasie viscerali	Milza
599-16	Lazio	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
600-16	Toscana	Rurale (livornese)	Neoplasie viscerali	Penne
608-16	Sardegna	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
610-16	Liguria (Genova)	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne

### **Estrazione del genoma e PCR**

L'estrazione del DNA virale da penne ed organi è stata eseguita utilizzando il kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Il DNA estratto è stato successivamente amplificato per il gene *meq* è stato seguendo il protocollo descritto da Hassanin *et al.*, 2013. I primers utilizzati sono *meq*-F 5'- ATGTCTCAGGAGCCAGAGCCG- 3' e *meq*-R 5'- GGGTCTCCCGTGACCTGG- 3'. I prodotti di PCR sono stati visualizzati, mediante luce ultravioletta dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1% addizionato con bromuro di etidio.

### **Allineamento, analisi di sequenza ed analisi filogenetica**

Gli amplificati del gene *meq* sono stati sequenziati presso il centro di sequenziamento Macrogen Europe. L'allineamento delle sequenze è stato eseguito utilizzando il programma *Clustal W* all'interno del software *BioEdit Alignment Editor*. L'analisi di sequenza è stata eseguita paragonando i ceppi di campo tra loro e con ceppi virali a diverso grado di patogenicità disponibili in *GenBank*. È stato inclusa nell'analisi anche la sequenza del gene *meq* di un ceppo vaccinale tipo Rispens comunemente utilizzato in Italia e qui denominato Risp 1. In Tabella 2 sono elencati i nomi dei ceppi di riferimento, il paese di origine, il patotipo (se noto) e il numero di accesso in *GenBank* relativamente alla sequenza del gene *meq*. L'analisi delle sequenze amminoacidiche delle proteine Meq ha previsto il conteggio del numero di ripetizioni di 4 proline (PPPP) e la valutazione del contenuto percentuale in prolina.

È stata inoltre eseguita un'analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche del gene *meq* e di quelle amminoacidiche della proteina Meq dei ceppi virali elencati nelle tabelle 1 e 2 e del ceppo vaccinale Risp 1. L'albero filogenetico è stato realizzato utilizzando il software MEGA6 con l'algoritmo *Neighbor-Joining*. Solo i nodi con valore di bootstrap (calcolato su 1000 replicati) pari o maggiore a 70 sono stati considerati attendibili.

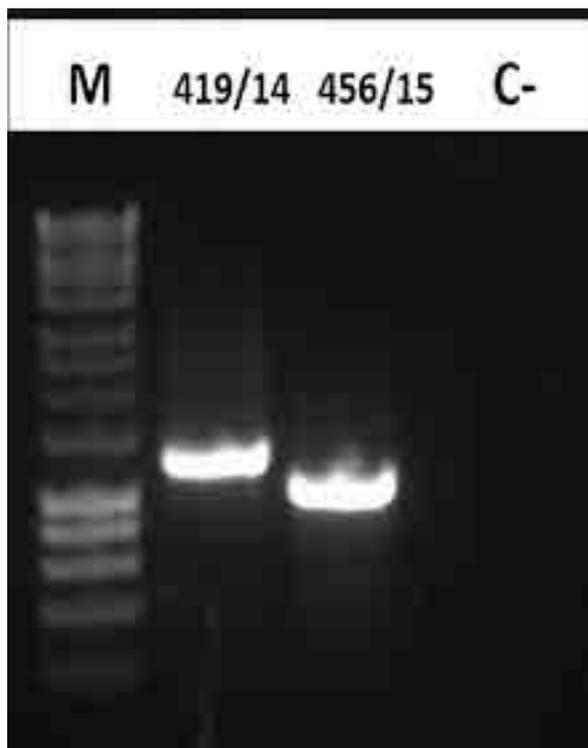
**Tabella 2.** Ceppi di MDV di riferimento pubblicati su *GenBank* utilizzati in questo studio.

<b>ISOLATO</b>	<b>PAESE D'ORIGINE</b>	<b>PATOTIPO</b>	<b>N°ACCESSO del GENE <i>meq</i> (<i>GenBank</i>)</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/ Rispons(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>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>ATE</b>	Ungheria	vvMDV	AY571784.1
<b>108_11</b>	Polonia	-	KJ464831.1
<b>116_11</b>	Polonia	-	KJ464833.1
<b>121_11</b>	Polonia	-	KJ464834.1
<b>122_11</b>	Polonia	-	KJ464835.1
<b>6_12</b>	Polonia	-	KJ464837.1
<b>56_12</b>	Polonia	-	KJ464839.1
<b>24_00</b>	Polonia	-	KJ464764.1

## RISULTATI

### PCR del gene *meq*

Tutti i campioni esaminati sono risultati positivi alla reazione di PCR per il gene *meq*, evidenziando prodotti di PCR di peso molecolare differente (Figura 1). Come risultato dell'amplificazione del genoma virale dei diversi campioni elencati in Tabella 1, è stata evidenziata la presenza di bande aventi peso molecolare differente a seconda del ceppo considerato. Nella Figura 1 sono riportate a titolo di esempio due bande di dimensioni diverse ottenute dalla PCR dei geni *meq* dei ceppi 419-14 e 456-15.



**Figura 1.** Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di PCR del gene *meq* ottenuti (relativi ai ceppi 419-14 e 456-15). Linea 1: Marker Bioline (M). Linea 2: campione 419-14. Linea 3: campione 456-15. Linea 4: controllo negativo.

### Analisi di sequenza e filogenetica del gene *meq*

Le sequenze nucleotidiche del gene *meq* sono state confrontate tra loro e con quelle dei ceppi a diversa patogenicità disponibili in *GenBank*. Come sequenza di riferimento è stata scelta quella del gene *meq* (1200 paia di basi) del vaccino commerciale CVI988/Rispens (Intervet), *GenBank accession number* DQ534538.1, avente una proteina Meq costituita da 399 amminoacidi (aa).

Sulla base dell'analisi di sequenza sono stati identificati diversi ceppi virali. I ceppi 456-15, 498-15, 513-15, 515-15, 559-15, 561-15, 565-15, 567-15 e 600-16, tutti rilevati in allevamenti industriali tranne il ceppo 600-16, presentavano un'identità di sequenza *meq* del 100% sia tra loro sia con le sequenze *meq* di ceppi MDV-1 rilevati in Polonia (*GenBank accession numbers*: KJ464831.1, KJ464833.1, KJ464834.1, KJ464835.1, KJ464837.1, KJ464839.1, KJ464764.1). Rispetto al ceppo vaccinale CVI988/Rispens, tali ceppi presentavano una delezione di 180 paia di basi corrispondente, nella proteina Meq, ad una delezione di 60 aa. La lunghezza della proteina risultava quindi di 339 aa vs i 399 della proteina del ceppo vaccinale CVI988/Rispens. All'analisi della sequenza nucleotidica sono state evidenziate 6 mutazioni puntiformi, tutte codificanti per amminoacidi differenti da quelli del ceppo vaccinale CVI988/Rispens. Le mutazioni e le loro posizioni nella proteina sono riportate in Tabella 3. Il numero totale di PPPP è risultato pari a 4 a differenza delle 8 del ceppo vaccinale, ciò è dovuto alla presenza di una mutazione puntiforme in posizione 218 (278 per CVI988) responsabile dell'interruzione di una ripetizione di 4 proline per la traduzione di una serina al posto di una prolina in posizione 3 (PPSP invece che PPPP).

Il ceppo 487-15, rilevato in un allevamento rurale, mostrava una percentuale di identità nucleotidica del 100% con il ceppo polacco 24-00 (*GenBank accession number* KJ464764.1). Rispetto al ceppo CVI988/Rispens la sequenza della proteina Meq del ceppo 487-15 mostrava una delezione e mutazioni puntiformi analoghe ai ceppi sopraelencati eccetto la presenza di una prolina in posizione 218 (Tabella 3). Erano quindi presenti 5 PPPP in luogo di 4.

L'analisi di sequenza ha poi evidenziato come il gene *meq* dei ceppi rurali 419-14, 507-15, 509-15, 510-15, 562-15 e 599-16 (1257 pb), rispetto a CVI988/Rispens, presentasse un'inserzione di 57 paia di basi, corrispondente ad un'inserzione di 19 aa nel dominio di transattivazione della proteina Meq (Tabella 4) e 9 mutazioni nucleotidiche puntiformi, di cui 8 codificanti (Tabella 3). La lunghezza della proteina Meq era di 418 aa. Il numero di ripetizioni di 4 proline era pari a 9, una in più rispetto a quelle rilevate all'analisi di sequenza di CVI988/Rispens.

La sequenza nucleotidica del ceppo rurale 608-16 presentava invece mutazioni puntiformi uguali a quelle rilevate nei ceppi sopraccitati tranne, che per due mutazioni puntiformi uguali a quelle dei ceppi vv e vv+, di cui una codificante (posizione 180 alanina in luogo di treonina). Era inoltre presente una delezione di 9 paia di basi (3aa) rispetto al ceppo vaccinale CVI988/Rispens, che si traduceva in una proteina Meq di 396 aa. Il numero di ripetizioni di 4 proline era 8 come nel caso del ceppo CVI988/Rispens (Tabella 4).

È stata inoltre eseguita l'analisi di sequenza di un ceppo vaccinale tipo Rispens utilizzato in Italia (Risp 1). Il gene *meq* di questo ceppo presentava una lunghezza di 1197 bp e due mutazioni puntiformi codificanti, rispetto al gene *meq* di CVI988/Rispens. Erano presenti 7 ripetizioni di 4 proline e non 8.

Il ceppo rurale 610-16 mostrava la stessa sequenza nucleotidica del gene *meq* di Risp 1 ma, rispetto a questo, presentava un'inserzione di 57 paia di basi. Il numero di PPPP era pari a 8 e la lunghezza totale della proteina Meq era di 417 amminoacidi.

**Tabella 3.** Sostituzioni amminoacidiche nella proteina Meq dei diversi ceppi presi in esame\*, in grigio sono evidenziati gli amminoacidi comuni al maggior numero di ceppi, nelle caselle bianche invece sono presenti le mutazioni puntiformi specifiche.

Patotipo	Ceppo	37	66	71	77	80	93	98	101	110	119	139	153	176	180	242	217 277	218 278	326 386
att	CVI988	H	G	S	E	D	Q	H	K	C	C	T	P	P	T	F	P	P	I
-	419-14																		
-	507-15																		
-	509-15	R	R	S	E	E	R	D	N	C	C	A	P	P	T	I	P	P	T
-	510-15																		
-	562-15																		
-	599-16																		
-	456-15																		
-	498-15																		
-	513-15																		
-	515-15																		
-	559-15	H	R	A	E	Y	Q	H	K	S	C	T	P	P	T	-	P	S	T
-	561-15																		
-	565-15																		
-	567-15																		
-	600-16																		
-	487-15	H	R	A	E	Y	Q	H	K	S	C	T	P	P	T	-	P	P	T
-	608-16	R	R	S	E	E	R	D	N	C	C	A	P	P	A	I	P	P	T
Vv+	X	H	R	S	K	D	Q	H	K	C	R	T	Q	A	A	-	A	P	T
vv	549	H	R	S	K	D	Q	H	K	C	C	T	Q	A	A	-	A	P	T
v	GA	H	R	S	K	D	Q	H	K	C	R	T	P	P	T	-	P	P	T

\*A = alanina; C = cisteina; D = acido aspartico; E = acido glutammico; F = fenilalanina; G = glicina; H = istidina; I = isoleucina; K = lisina; N = asparagina; P = prolina; Q = glutammina; R = arginina; S = serina; T = treonina; Y = tirosina

All'analisi filogenetica è stato osservato che i ceppi 456-15, 498-15, 513-15, 515-15, 559-15, 561-15, 565-15, 567-15, 600-16 rientravano in un unico cluster insieme ai ceppi isolati in Polonia (percentuale di identità nucleotidica e amminoacidica del 100%). Le percentuali d'identità nucleotidica ed amminoacidica con le sequenze dei ceppi a patogenicità nota disponibili in *GenBank* scendevano a valori minori del 98,5%. I valori più elevati sono stati riscontrati con le sequenze dei ceppi *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus*.

Il ceppo 487/15 rientrava nel cluster sopracitato però presentava 5 ripetizioni di 4 proline analogamente ai ceppi vvMDV 04CRE, 02LAR e RB1B.

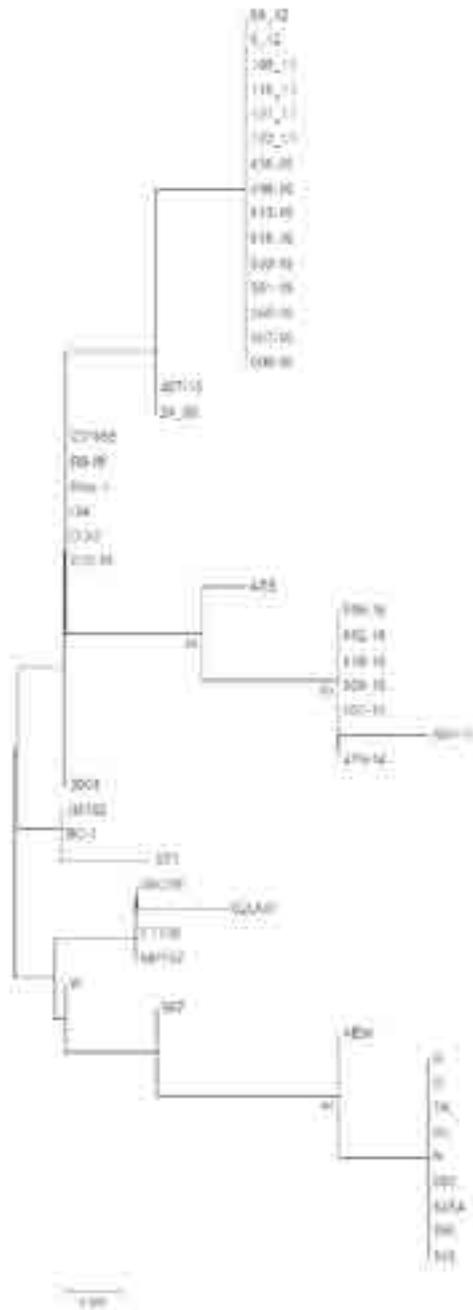
Anche i ceppi 419-14, 507-15, 509-15, 510-15, 562-15 e 599-16 rientravano in un cluster distinto, insieme al ceppo very virulent ATE (Figura 2). Questi ceppi presentavano il più alto numero di ripetizioni di 4 proline (9) ed un elevato contenuto percentuale di prolina (23,6%) (Tabella 4). Le più alte percentuali d'identità nucleotidiche del gene *meq* di ceppi sono state riscontrate con quelle dei ceppi attenuati CVI988/Rispens e 3004 e mild CU-2.

**Tabella 4.** Caratteristiche della proteina Meq nei ceppi elencati nelle Tabelle 1 e 2.

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
Risp 1	398	59	23,06	7	
CU-2	398	59	23,1	7	mMDV
BC-1	398	59	23,1	7	vMDV
GA	339	-	21,5	4	vMDV
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

<b>571</b>	339	-	21,2	3	vMDV
<b>595</b>	339	-	20,6	2	vvMDV
<b>648A</b>	339	-	20,9	2	vv+MDV
<b>686</b>	339	-	20,9	2	vv+MDV
<b>3004</b>	398	59	23,1	6	attMDV
<b>LMeq</b>	398	59	23,1	7	ND
<b>ATE</b>	339	-	21,47	5	
<b>6_12</b>	339	-	21,2	4	ND
<b>56_12</b>	339	-	21,2	4	ND
<b>122_11</b>	339	-	21,2	4	ND
<b>121_11</b>	339	-	21,2	4	ND
<b>116_11</b>	339	-	21,2	4	ND
<b>108_11</b>	339	-	21,2	4	ND
<b>419-14 507-15 509-15 510-15 562-15 599-16</b>	418	79	23,63	9	ND
<b>456-15 498-15 513-15 515-15 559-15 561-15 565-15 567-15 600-16</b>	339	-	21,18	4	ND
<b>487-15</b>	339	-	21,47	5	ND
<b>608-16</b>	396	57	22,92	8	ND
<b>610-16</b>	417	78	23,44	8	ND

att=attenuato; m=mild; v=virulent; vv=very virulent; vv+= very virulent plus; ND= non determinato.



**Figura 2.** Albero filogenetico relativo alle sequenze della proteina Meq dei diversi ceppi virali elencati nelle Tabelle 1 e 2.

## DISCUSSIONE

I ceppi di MDV-1 analizzati in questo studio sono stati rilevati in animali, sia rurali che industriali, vaccinati o meno, colpiti da differenti forme patologiche ascrivibili alla malattia di Marek.

È stato scelto il gene *meq* per la caratterizzazione molecolare dei virus rilevati poiché è quello che permette una migliore differenziazione dei ceppi virali per la presenza di mutazioni correlabili alla virulenza in ceppi virali appartenenti a patotipi differenti (Shamblin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2000). Esso viene considerato il gene di MDV-1 maggiormente coinvolto nell' oncogenesi (Lupiani *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2009). Le dimensioni del gene *meq full length* amplificato, variavano nei diversi ceppi di MDV-1 a seconda dell'isoforma del gene (Chang *et al.*, 2002 a; Chang *et al.*, 2002 b). Nel settore industriale gli animali sottoposti a necropsia presentavano le tipiche lesioni anatomopatologiche associate alla forma viscerale della malattia di Marek con marcate epatomegalia e splenomegalia. In tutti questi animali sono stati rilevati ceppi che presentavano la stessa sequenza della proteina Meq (339 aa), contenute un basso livello percentuale di prolina (21,1%) e un basso numero di ripetizioni di 4 proline (4). Questi dati, insieme alle maggiori percentuali di identità nucleotidica riscontrate con ceppi a maggior virulenza fanno pensare che questi ceppi appartengano ad un patotipo virulento. Tutti questi ceppi inoltre rientravano in un unico cluster all'analisi filogenetica, insieme ai ceppi isolati in Polonia. Nella maggior parte degli allevamenti era stato impiegato un protocollo vaccinale rigoroso: la vaccinazione era eseguita sia *in ovo* sia al primo giorno di vita con un vaccino bivalente Rispens + HVT. Le cause di rottura vaccinale potevano essere disparate e tra queste vi erano: la virulenza del ceppo virale, errori nella somministrazione o nella gestione del vaccino (dose non adeguata, errori nella ricostituzione e nel mantenimento della catena del freddo), la sensibilità legata alla genetica, la presenza di patologie immunodepressive concomitanti e gli eventi stressanti.

Nel settore rurale la maggior parte delle forme patologiche rilevate erano ascrivibili alla forma classica della malattia di Marek con sintomatologia neurologica (paralisi spastica degli arti). Questi animali all' esame necroscopico evidenziavano un aumento di volume più o meno marcato dei nervi periferici. In tutti questi casi è stata rilevata la presenza di ceppi virali aventi la stessa sequenza del gene *meq* che codificava per una proteina di 418 aminoacidi, con un inserzione di 19 aminoacidi rispetto al ceppo vaccinale CVI988/Rispens, un elevato contenuto percentuale di prolina (23,6%) e la presenza di 9 ripetizioni di quattro proline nel dominio di transattivazione. Quest'ultima caratteristica dovrebbe determinare una super repressione dell'attività di transattivazione della proteina Meq ed una riduzione dell'oncogenicità di questi ceppi (Chang *et al.*, 2002a). In nessuno degli animali esaminati sono stati rilevati linfomi viscerali, ciò permette di pensare che il virus possieda bassa oncogenicità. Anche l'elevata percentuale di identità nucleotidica con il gene *meq* di ceppi *mild* e attenuati è un ulteriore conferma di quanto detto sopra. È importante ricordare come questi ceppi presentino una serie di mutazioni puntiformi uniche e assenti in tutti gli altri ceppi analizzati e come all'analisi filogenetica essi rientrino in un cluster distinto.

Oltre ai ceppi sopra descritti, in ambito rurale sono stati evidenziati 2 ceppi virali potenzialmente ascrivibili a patotipo virulento. Un ceppo è stato rilevato in un allevamento sito a Cuneo in cui la mortalità aveva sfiorato il 100% per neoplasie viscerali

multiple ed il gene *meq* codificava per una proteina di 339 aa con 5 PPPP e un basso contenuto % di prolina (21,47). Nell'altro focolaio, verificatosi in un allevamento sito in Toscana, vi era un'elevata mortalità con associata epatomegalia, splenomegalia ed aumento di spessore della parete dello stomaco ghiandolare. Il gene *meq* di questo ceppo presentava una percentuale di identità nucleotidica pari al 100% con i ceppi rilevati nel settore industriale.

Va ricordato che la patotipizzazione dei ceppi di MDV-1 richiede prove *in vivo* secondo il metodo ADOL proposto da Witter nel 1997 e rivisitato sempre da Witter *et al.* nel 2005, basato sull'induzione di lesioni linfoproliferative in animali vaccinati. Deve essere valutata anche la diversa sensibilità genetica alla malattia nelle diverse razze di animali. È noto che certi aplotipi del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) o complesso B del pollo possano determinare suscettibilità o resistenza nei confronti della malattia. In particolare è noto che l'aplotipo B<sup>19</sup> conferisce suscettibilità mentre l'aplotipo B<sup>21</sup> conferisce resistenza nei confronti della malattia di Marek (Wang *et al.*, 2014). È possibile che gli animali vaccinati che presentavano la patologia fossero quelli maggiormente suscettibili, lo stesso vale per gli animali rurali colpiti dalla forma classica della malattia. Per tali motivi l'aplotipo dell'MHC di questi soggetti verrà in futuro determinato mediante approccio molecolare.

In conclusione ceppi del virus della malattia di Marek ad elevata virulenza sembrano circolare sia nel settore industriale, nonostante la vaccinazione venga routinariamente applicata, sia nel settore rurale. Nel settore rurale, dove nella maggior parte dei casi gli animali non vengono vaccinati, è stata riscontrata anche la presenza di ceppi virali a bassa virulenza. È necessario tenere conto del fatto che i dati ottenuti in questo studio sono molecolari e che future indagini saranno indirizzate all'isolamento e alla patotipizzazione *in vivo* al fine di confermare la reale circolazione di ceppi con tali caratteristiche.

## **BIBLIOGRAFIA**

Brown, A. C., L. P. Smith, L. Kgosana, S. J. Baigent, V. Nair, and M. J. Allday 2009. Homodimerization of the Meq Viral Oncoprotein Is Necessary for Induction of T-Cell Lymphoma by Marek's Disease Virus. *J. Virol.* 83:11142–11151.

Calnek, B.W., Adldinger, H.K., Kahn, D.E., 1970. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Diseases* 14, 219-233.

Camarda A., di Pineto L., 2012. Stato sanitario della gallina ovaioia in Italia. Atti del LI Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Salsomaggiore Terme 11-12 ottobre 2012.

Chang, K.S., Lee, S.I., Ohashi, K., Ibrahim, A., Onuma, M., (2002a). The detection of the *meq* gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 413-417.

Chang, K.S., Ohashi, K., Onuma M., (2002b). Diversity (Polymorphism) of the *meq* Gene in the Attenuated Marek's Disease Virus (MDV) Serotype 1 and MDV-Transformed Cell Lines. *Journal of Veterinary Medical Science* 64: 1097-1101.

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.

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.

Lupiani B, Lee L.F, Cui x, Gimeno I, Anderson A, Morgan R.W, Silva R.F, Witter R.L, Kung H-J, Reddy S.M, 2000. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11815-11820.

Mescolini G., Lupini C., Felice V., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Catelli E. (2015). Caratterizzazione molecolare di un ceppo mild del virus della malattia di Marek evidenziato in polli rurali con forma nervosa. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2015. LIV Convegno annuale. Forlì, 16-17 aprile 2015. pp 230-244.

Piccirillo,A., 2011. Malattia di Marek nei riproduttori pesanti: una malattia riemergente del settore avicolo? Atti del L Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì7-8 aprile 2011.

Silva, R.F., Reddy, S.M., Lupiani, B., 2004. Expansion of a unique region in the Marek's disease virus genome occurs concomitantly with attenuation but is not sufficient to cause attenuation. *Journal of Virology*78, 733-740.

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.

Wang<sup>1</sup> H, Ma<sup>1</sup> T, Chang G, Wan F, Liu X, Liu L, Xu L, Chen J, Chen G, 2014. Molecular Genotype Identification of Different Chickens: Major Histocompatibility Complex. *The Open Access Journal of Sciences and Technology* 2.

Witter, R.L., 1997. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases* 41, 149-163.

Witter, R.L., Burgoyne, G.H., Burmester, B.R., 1968. Survival of Marek's disease agent in litter and droppings. *Avian Diseases* 12, 522-530.

Witter, R.L., Calnek, B.W., Buscaglia, C., Gimeno, I.M., Schat, K.A., 2005. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathology* 34, 75-90.

# INFEZIONE SPERIMENTALE CON *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN POLLI DA CARNE: RISULTATI PRELIMINARI

Moronato M.L.<sup>1,2</sup>, Gobbo F.<sup>2,1</sup>, Mainenti M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>3</sup>, Catania S.<sup>1</sup>, Martini M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020, Legnaro, Padova (PD), MAPS – Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute.

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTL - Laboratorio di Medicina Aviaria, Unità Operativa Micoplasmi, Viale dell'Università, 10, 35020, Legnaro, Padova (PD)

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) - Italia

## Summary

Avian *Metapneumovirus* is a respiratory pathogen causing the *Turkey Rhinotracheitis* (TRT). It is associated to the *Swollen Head Syndrome* in broilers, but its role as primary respiratory pathogen in this host is nowadays not completely defined. *Mycoplasma synoviae* is a respiratory bacterial pathogen whose importance increased in the last few years. The greater relevance of aMPV and MS in the poultry sector and the lack of experimental studies regarding their co-infection in broilers led to this infection model for the reproduction of clinical respiratory disease.

The preliminary results evidenced by the clinical and laboratory investigations suggests the possible synergic interaction between aMPV and MS.

## INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus* aviare (aMPV) è l'agente eziologico della rinotracheite del tacchino, una patologia acuta di tipo respiratorio caratterizzata da elevata morbilità e bassa mortalità (1). Nel pollo informazioni provenienti dal campo, testimoniano un aumento delle forme cliniche respiratorie correlabili ad aMPV, tuttavia il ruolo del virus come agente patogeno primario è ancora oggi meno definito in questa specie (2). *Mycoplasma synoviae* (MS) è un patogeno aviare responsabile di diverse forme cliniche tra le quali forme respiratorie, sinovite infettiva (3) e nella gallina ovaia di una sindrome chiamata "*Eggshell Apex Abnormalities*" (4). L'importanza di MS, in passato considerata minore rispetto a *Mycoplasma gallisepticum* (MG), è stata recentemente rivalutata sia a livello nazionale che europeo (5).

La percezione di un aumento nella prevalenza di entrambi i patogeni nel pollo e l'assenza di studi sperimentali in questa specie hanno portato alla stesura del presente studio.

L'obiettivo è quello di riprodurre sperimentalmente l'infezione respiratoria da *Metapneumovirus* aviare e *Mycoplasma synoviae* nel pollo da carne, mimando il più possibile le condizioni di campo, sia per i tempi che per le modalità di infezione. E' stato quindi valutato il possibile effetto sinergico tra i due patogeni, attraverso l'analisi dei risultati clinici, necroscopici e laboratoristici dei diffe-

renti gruppi sperimentali. Nel presente lavoro si riportano i dati preliminari ad oggi disponibili.

## **MATERIALI E METODI**

Per la prova sperimentale sono stati utilizzati 160 polli da ingrasso di 1 giorno di vita separati a random in 4 gruppi e stabulati nel rispetto delle comuni condizioni di benessere animale per tutta la durata della prova (35 giorni).

Sia il giorno dell'arrivo che prima dell'inoculazione sperimentale 10 soggetti per isolatore sono stati controllati per aMPV, MS ed MG tramite sierologia e real-time PCR. L'infezione virale è avvenuta a 15 giorni di vita (isolatore A e B) inoculando *Metapneumovirus*, sottotipo B, isolato da pollo con sintomatologia respiratoria per via oculo-nasale. Gli animali appartenenti ai gruppi B e C hanno ricevuto a 18 giorni di vita l'inoculo di *Mycoplasma synoviae* per la medesima via di somministrazione. Gli animali appartenenti al gruppo controllo hanno ricevuto le medesime manipolazioni e l'inoculo di MEM sterile e brodocoltura sterile per micoplasma. Il gruppo/isolatore A presentava animali infettati con aMPV, il gruppo/isolatore B animali infettati con aMPV ed MS, il gruppo/isolatore C animali infettati con MS ed infine il gruppo/isolatore E animali controllo negativo.

Gli animali sono stati esaminati quotidianamente e per tutta la durata della prova e l'eventuale forma clinica è stata classificata secondo un sistema di *clinical score* con particolare attenzione nei confronti dell'apparato respiratorio.

A partire dal giorno 18 di vita si è proceduto al prelievo ematico e al sacrificio di 5 animali per ciascun gruppo, selezionati a random, secondo cadenze regolari: 18, 20, 22, 25, 30 e 35 giorni di vita. I soggetti sacrificati sono stati sottoposti ad esame autoptico completo e a classificazione delle lesioni anatomico-patologiche riscontrate secondo un sistema a punteggio. In sede autoptica si è proceduto ad effettuare i campionamenti per l'esecuzione delle analisi real-time PCR aMPV e real-time PCR MS da organi target dell'apparato respiratorio (turbinati nasali, congiuntiva, trachea, sacchi aerei, polmoni) e da altri quali milza, rene, tonsille cecali, cervello, cloaca.

## **RISULTATI**

In seguito all'inoculo oculo-nasale gli animali hanno mostrato sieroconversione verso entrambi i patogeni.

I principali sintomi riscontrati nel corso della prova sperimentale sono stati edema peri-palpebrale, fame d'aria, testa gonfia, congiuntivite, depressione/letargia, respirazione difficoltosa e scolo nasale. Non è stata evidenziata mortalità in nessun isolatore.

Per quanto concerne le lesioni macroscopiche dell'apparato respiratorio i soggetti appartenenti al gruppo A (aMPV) hanno mostrato complessivamente il maggior numero di lesioni a carico della congiuntiva, seguiti dal gruppo B (aMPV+MS) ed infine il gruppo C (MS). A carico dei turbinati nasali il gruppo B (aMPV+MS) ha evidenziato il maggior numero di lesioni. A carico della trachea il maggior numero di lesioni è stato identificato nel gruppo B (aMPV+MS), seguito dal gruppo C (MS) ed infine dall'A (aMPV).

Si riportano nella Tabella 1 i risultati delle PCR aMPV e MS (numero di soggetti positivi/esaminati) nei diversi isolatori (A, B, C) distinti per organo nel tempo.

Tabella 1		MOMENTO PRELIEVO												
ISOLATORE	ORGANO	18 gg di vita			20 gg di vita		22 gg di vita		25 gg di vita		29 gg di vita		35 gg di vita	
		aMPV	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS
A (aMPV)	Turbinati	5/5	5/5	n.d.	4/5	n.d.	1/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.
	Trachea	4/5	5/5	n.d.	5/5	n.d.	1/5	n.d.	0/5	n.d.	2/5	n.d.		
	Congiuntiva	5/5	5/5	n.d.	3/5	n.d.	1/5	n.d.	1/5	n.d.	0/5	n.d.		
	Sacco aereo	1/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.		
	Polmone	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.		
	Milza	1/5	2/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.		
	Rene	1/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.		
	Tonsille	0/5	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.		
	Cloaca	0/5	3/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.		
Cervello	0/5	1/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.			
B (aMPV + MS)	Turbinati	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	1/5	5/5	3/5	5/5		
	Trachea	2/5	5/5	5/5	4/5	3/5	2/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5		
	Congiuntiva	3/5	5/5	5/5	3/5	5/5	1/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5		
	Sacco aereo	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	1/5		
	Polmone	0/5	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	4/5	0/5	3/5	0/5	3/5		
	Milza	0/5	2/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5		
	Rene	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5		
	Tonsille	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5		
	Cloaca	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5		
Cervello	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	3/5	0/5	1/5			
C (MS)	Turbinati	n.d.	n.d.	5/5	n.d.	0/5	n.d.	5/5	n.d.	5/5	n.d.	5/5		
	Trachea	n.d.	n.d.	4/5	n.d.	0/5	n.d.	5/5	n.d.	5/5	n.d.	5/5		
	Congiuntiva	n.d.	n.d.	5/5	n.d.	5/5	n.d.	5/5	n.d.	5/5	n.d.	5/5		
	Sacco aereo	n.d.	n.d.	0/5	n.d.	1/5	n.d.	1/5	n.d.	1/5	n.d.	3/5		
	Polmone	n.d.	n.d.	2/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	3/5	n.d.	2/5		
	Milza	n.d.	n.d.	1/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5		
	Rene	n.d.	n.d.	0/5	n.d.	1/5	n.d.	0/5	n.d.	5/5	n.d.	0/5		
	Tonsille	n.d.	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	1/5	n.d.	0/5		
	Cloaca	n.d.	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	0/5	n.d.	3/5	n.d.	0/5		
Cervello	n.d.	n.d.	0/5	n.d.	2/5	n.d.	0/5	n.d.	2/5	n.d.	0/5			
n.d. = not done														

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio sperimentale è stato diretto a riprodurre l'infezione da aMPV ed MS, in qualità di agenti singoli ed in co-infezione in broiler. Il disegno sperimentale ha mimato il più possibile le condizioni di campo tramite la scelta della tempistica e delle modalità di infezione, discostandosi dalla maggior parte degli studi presenti in bibliografia.

A differenza di quanto evidenziato nel gruppo a singola infezione, gli animali del gruppo co-infetto hanno mantenuto la positività in PCR aMPV da turbinati nasali per tutta la durata della prova. Inoltre, sia nel gruppo B che nel gruppo C c'è stata un'ampia diffusione di MS testimoniata dalla positività in PCR da milza, polmone, cervello, cloaca, sacco aereo e tonsille cecali. Tuttavia, solo nel gruppo co-infetto la PCR MS è risultata positiva da rene e il numero di soggetti con PCR positiva dai diversi organi è risultato superiore a quanto evidenziato nel gruppo C.

I dati preliminari ad oggi disponibili suggeriscono la possibile presenza di un effetto sinergico tra aMPV e MS nella specie pollo. L'interazione tra i due agenti patogeni potrebbe essere supportata da una maggiore diffusione sistemica, una prolungata positività post-infezione e un numero maggiore di animali positivi nel gruppo co-infetto se paragonato a quelli a singola infezione.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. R.E. Gough & R.C. Jones (2008). Avian Metapneumovirus. *Disease of Poultry* 12<sup>th</sup> Ed., 100-110.
2. J.K.A. Cook (2000). Avian Pneumovirus infection of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal*, 160, 118-125.
3. 1. Kleven S.H and Ferguson-Noel N. Mycoplasma synoviae infection. Chapter 21, Mycoplasmosis. In: *Disease of poultry* 13<sup>th</sup> Edition, Swayne David E. Blackwell publishing.
4. Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Terregino C., Iob L., Nicholas R.A. 2010. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by Mycoplasma synoviae infection. *Avian diseases*, 54(2):961-4.
5. Landman WJ. (2014). Is Mycoplasma synoviae outrunning Mycoplasma gallisepticum? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol.*;43(1):2-8. doi: 10.1080/03079457.2014.881049.

## **ISOLAMENTO DI AVIAN NEPHRITIS VIRUS (ANV) SU UOVA EMBRIONATE DI POLLO SPF: RISULTATI PRELIMINARI**

Parigi M., Fregnani G., Caminiti A., Fiorentini L., Massi P., Tosi G.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì.*

### **Summary**

Avian Nephritis Virus (ANV) is an astrovirus considered cause of diarrhea, interstitial nephritis, uricosis and dead in different avian species. In this study we reported the preliminary results of isolation, propagation and pathological characteristics of ANV in specific pathogen free (SPF) chicken embryonated eggs (CEE) from chickens and guinea-fowls with enteric and renal lesions. The CEE were inoculated via the yolk sack route at 14 days of incubation and the viral isolation was confirmed using PCR techniques. The embryos were small and presented several abnormalities in the internal organs, as livers enlarged and yellow, enlarged intestines filled with water and prominent ureter and urate deposition in the kidney. The viral replication was confirmed by RT-PCR in all the second-passage inocula.

### **INTRODUZIONE**

Il virus della Nefrite Infettiva Aviaria (Avian Nephritis Virus, ANV), solo recentemente classificato come astrovirus (1), viene considerato causa di diarrea, nefrite interstiziale, tubulonefrosi, uricosi (gotta) e morte nella specie avicole (2); gli animali giovani sono considerati più suscettibili (3), ma ne è stata rilevata la presenza anche in broilers che manifestavano scarso accrescimento ponderale e problemi renali (4). Tale virus, in associazione completa o parziale con altri virus enterici, quali Chicken Astrovirus (CAstV), Reovirus, Rotavirus e Chicken Parvovirus, viene ritenuto responsabile di condizioni cliniche quali, ritardo della crescita, depressione, ridotta conversione alimentare e bassa mortalità, altresì chiamate “runting-stunting syndromes”. In questo lavoro, riportiamo l'isolamento di Avian Nephritis Virus, e le lesioni macroscopiche riferibili alla sua replicazione, su uova embrionate di pollo SPF a partire da campioni di rene e contenuto intestinale di due diverse specie avicole.

### **MATERIALI E METODI**

#### **Scelta e preparazione degli inoculi**

Gli inoculi utilizzati in questo studio sono stati scelti tra i campioni conferiti al laboratorio di Virologia della sede di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna nel periodo marzo-maggio 2016 al fine di essere testati per la presenza di virus enterici (Reovirus, Rotavirus, Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus) mediante RT-PCR. I quattro campioni selezionati erano risultati positivi unicamente per la presenza di Avian Nephritis Virus (ANV) e, di questi, 2 erano stati prelevati da polli e 2 da faraone. Fatta eccezione per una delle due faraone che all'esame anatomopatologico presentava solo segni di nefrite, gli altri 3 animali mostravano enterite di gravità variabile (Tabella 1). I campioni di rene e di intestino (contenuto e parete) sono stati preparati mediante sospensione di circa 1 g di organi (finemente sminuzzati) in 9 ml di PBS sterile (pH 7.4) e centrifugati a 3000

rpm per 7 minuti. Prima di procedere con l'inoculo delle uova, ciascuna sospensione virale è stata prima addizionata con una soluzione di antibiotici costituita da gentamicina, streptomina ed amfotericina B e, infine, filtrata utilizzando filtri a porosità decrescente da 1.2 µm- 0.45 µm- 0.2 µm.

### **Inoculazione di uova embrionate di pollo SPF**

Fino al loro utilizzo, le uova embrionate di pollo Specific Pathogen Free (SPF; Charles River Laboratories International, Inc.) da utilizzare nello studio sono state mantenute, in incubatrice semiautomatica, alla temperatura di 37.5 gradi e ad un tasso di umidità del 50%. Per ogni inoculo sono state utilizzate uova a 14 giorni di incubazione, età in cui è già avvenuto il completo sviluppo anatomico e funzionale del tratto intestinale. L'unica via di inoculazione presa in considerazione è stata quella intravitellina. Ogni uovo è stato, quindi, disinfettato esternamente mediante tintura di iodio al 10% e punzonato nel punto scelto in fase di speratura. Per ogni campione, 5 uova sono state inoculate con 0.2ml di sospensione virale, mentre 1 uovo è stato utilizzato come controllo negativo e inoculato con 0.2 ml di PBS sterile. La vitalità embrionale è stata controllata giornalmente per 5 giorni post-inoculazione (p.i), al termine dei quali le uova rimaste vive sono state soppresse mediante refrigerazione. La morte nelle prime 24 ore dall'inoculazione è stata considerata aspecifica, mentre le uova morte a partire dal 2° giorno di incubazione e le uova soppresse al termine dei 5 giorni p.i sono state esaminate ai fini di evidenziare lesioni anatomopatologiche. Dagli embrioni di ciascun inoculo sono stati prelevati, in pool, fegato, milza, stomaco ghiandolare e muscolare, pacchetto intestinale e reni; tale omogenato di organi è stato risospeso in PBS sterile, centrifugato a 3000 rpm per 7 minuti ed utilizzato per eseguire un secondo passaggio secondo le modalità descritte sopra. Anche dagli embrioni del secondo passaggio sono stati prelevati, in pool, i medesimi organi e gli omogenati sono stati preparati come descritto in precedenza.

### **Valutazione delle lesioni e conferma dell'isolamento virale**

Un accurato esame necroscopico è stato eseguito su ogni uovo inoculato. Gli embrioni sono stati analizzati sia per la presenza di alterazioni esterne quali, nanismo, arresto della crescita (stunting), aspetto gelatinoso ed edematoso, presenza di deformità, emorragie, sia per la presenza di alterazioni a livello di organi interni, in particolare fegato, stomaci, milza, reni ed intestino. Per ogni inoculo, la conferma dell'avvenuto isolamento virale è stata eseguita mediante RT-PCR multiplex (5) sui campioni ottenuti alla fine di ogni passaggio. Gli embrioni che presentavano lesioni macroscopiche e che sono risultati positivi allo screening molecolare sono stati considerati positivi.

### **Multiplex RT-PCR**

Per ogni inoculo, i campioni ottenuti alla fine di ogni passaggio sono stati sottoposti ad estrazione del DNA ed RNA mediante estrattore semiautomatico KingFisher Flex (ThermoScientific) e gli estratti ottenuti sono stati testati mediante una multiplex RT-PCR (5) in grado di differenziare ed identificare contemporaneamente la presenza di Reovirus, Rotavirus, Chicken Astrovirus e Avian Nephritis Virus.

## **RISULTATI**

### **Lesioni macroscopiche**

L'inoculo 41 è stato l'unico in cui non è stata evidenziata mortalità in nessuno dei due passaggi, mentre nei rimanenti inoculi, la mortalità è stata sporadica e diluita nei

5 giorni p.i. Nel primo passaggio, gli inoculi 41 e 46 non hanno mostrato lesioni riferibili a replicazione virale, mentre nei rimanenti 2 sono state riscontrate sia lesioni esterne sia alterazioni a carico degli organi interni, quali dimensioni ridotte dell'embrione con colorazione verdastra del sacco vitellino, fegati aumentati di volume, friabili e giallastri, ventricoli e proventricoli edematosi ed aumentati di volume, dilatazione delle anse intestinali, in particolare del duodeno e dell'ampolla rettale, reni aumentati di volume con dilatazione degli ureteri e depositi di urati (gotta). Due inoculi presentavano anche splenomegalia. Tali lesioni sono state riscontrate anche negli embrioni dei secondi passaggi di tutti gli inoculi, ma di minore intensità a livello renale ed accentuate a livello dell'intestino. L'ampolla rettale in alcuni soggetti, infatti, si presentava fortemente dilatata, quasi palloni-forme con un contenuto anche schiumoso e di colore verde. Le lesioni si presentavano sia negli embrioni morti spontaneamente sia in quelli soppressi.

### **Conferma dell'isolamento virale mediante RT-PCR**

I risultati dell'isolamento virale sono stati riassunti nella Tabella 1.

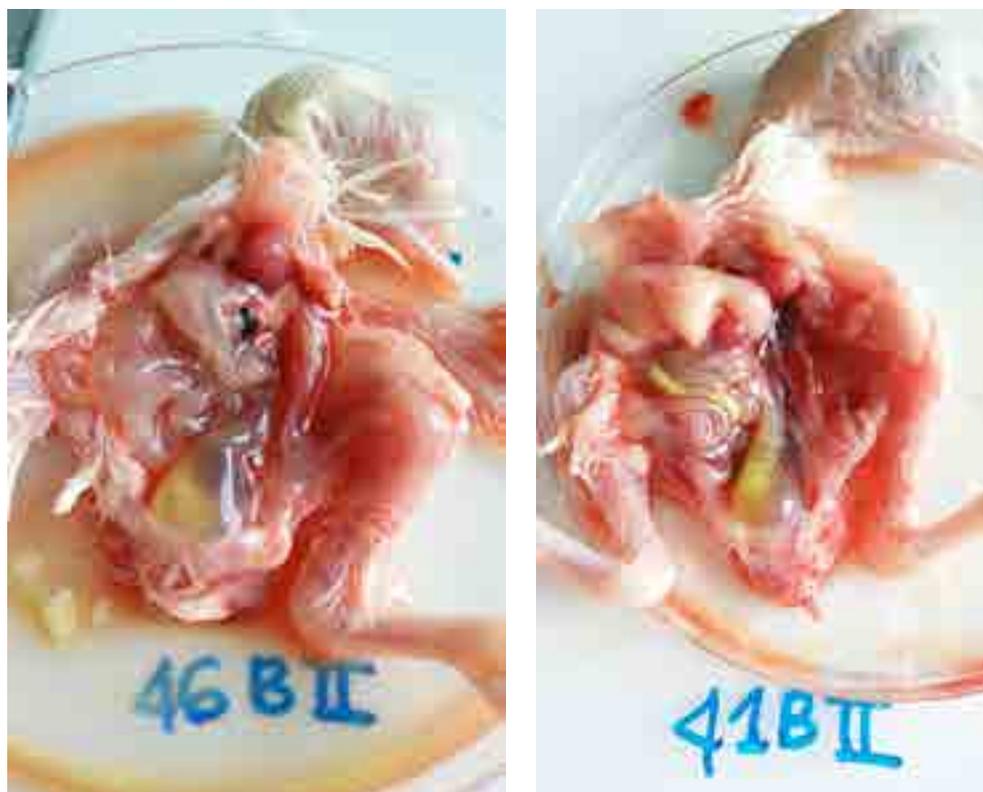
## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

In questo studio sono stati riportati i risultati preliminari dell'isolamento di Avian Nephritis Virus su uova SPF a partire da campioni prelevati da diverse specie avicole (pollo e faraona) che presentavano, rispettivamente, disturbi enterici e renali. Considerando che l'età embrionale rappresenta un fattore determinante nella buona riuscita di un isolamento virale, l'inoculazione è stata eseguita su uova a 14 giorni di incubazione a livello di sacco vitellino. Infatti a tale età, l'apparato gastroenterico degli embrioni risulta essere non solo completamente formato, ma anche totalmente funzionante (6). Nonostante in uno studio precedente (4) sia stata utilizzata l'inoculazione intrallantoidea per l'isolamento del Chicken Astrovirus, in questo studio, in relazione alla natura anche enterotropica del virus e alla funzione nutritiva del sacco vitellino, è stato deciso di testare unicamente la via di inoculazione intravitellina con l'obiettivo di facilitare la replicazione virale e di ottenere lesioni anatomopatologiche significative. A conferma di questa ipotesi, negli embrioni sono state rilevate lesioni non solo compatibili con l'avvenuta replicazione di un virus enterotropo, ma, in alcuni casi, lesioni simili a quelle descritte in sede necroscopica in animali che manifestavano riduzione della crescita associata a sindromi enteriche (runting stunting syndrome), come ad esempio presenza di bolle a livello duodenale e dilatazione dell'ampolla rettale. Al contrario, Nunez e collaboratori (2015) (7), nel loro studio sull'isolamento di Chicken Astrovirus su uova SPF, non avevano osservato lesioni macroscopiche in nessuno degli embrioni infettati a 14 giorni, nonostante la positività evidenziata in multiplex RT-PCR fin dal primo passaggio. Nel nostro lavoro, invece, nonostante le lesioni macroscopiche fossero evidenti già nel primo passaggio, solo in un inoculo l'isolamento del virus è stato confermato in RT-PCR già nel primo passaggio e per gli altri 3 campioni la conferma di avvenuta replicazione virale è avvenuta solo alla fine secondo passaggio.

Per una migliore e più approfondita conoscenza del comportamento del virus, è necessario procedere con ulteriori tentativi di isolamento del virus testando, non solo diversi giorni di inoculazione, ma anche altre vie di inoculazione, ad esempio quella intrallantoidea.

N° INOCULO	ORIGINE DEL CAMPIONE	LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE DEGLI ANIMALI DA CUI SONO STATI PREPARATI GLI INOCULI DI PARTENZA	ISOLAMENTO ANV	
			1° PASSAGGIO	2° PASSAGGIO
41/16	faraona	Nefrite	Neg	Pos
43/16	faraona	Enterite catarrale e bolle nei ciechi	Neg	Pos
44/16	pulcino	Tiflite con contenuto schiumoso	Pos	Pos
46/16	pulcino	Lieve enterite	Neg	Pos

**Tabella 1:** Storia clinica degli animali da cui sono stati preparati gli inoculi di partenza e risultati degli isolamenti



**Fig. 1-2.** A sx aumento di volume ed edema del ventriglio con dilatazione dell'ampolla rettale; a dx forte dilatazione delle anse intestinali e dell'ampolla rettale.



**Fig. 3.** Aumento di volume dei reni con dilatazione degli ureteri e deposito urati

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Imada T, Yamaguchi S, Mase M, Tsukamoto K, Kubo M, Morooka A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *Journal of virology*. 2000;74(18):8487-93.
2. Shirai J, Tanimura N, Uramoto K, Narita M, Nakamura K, Kawamura H. Pathologically and serologically different avian nephritis virus isolates implicated in etiology of baby chick nephropathy. *Avian diseases*. 1992;36(2):369-77.
3. Imada T, Taniguchi T, Yamaguchi S, Minetoma T, Maeda M, Kawamura H. Susceptibility of chickens to avian nephritis virus at various inoculation routes and ages. *Avian diseases*. 1981;25(2):294-302.
4. Bulbule NR, Mandakhalikar KD, Kapgate SS, Deshmukh VV, Schat KA, Chawak MM. Role of chicken astrovirus as a causative agent of gout in commercial broilers in India. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2013;42(5):464-73.
5. Day JM, Spackman E, Pantin-Jackwood M. A multiplex RT-PCR test for the differential identification of turkey astrovirus type 1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus, and avian rotavirus. *Avian diseases*. 2007;51(3):681-4.
6. Karcher DM, Applegate T. Survey of enterocyte morphology and tight junction formation in the small intestine of avian embryos. *Poultry science*. 2008;87(2):339-50.
7. Nunez LF, Parra SH, Mettifogo E, Catroxo MH, Astolfi-Ferreira CS, Piantino Ferreira AJ. Isolation of chicken astrovirus from specific pathogen-free chicken embryonated eggs. *Poultry science*. 2015;94(5):947-54.

# **EVIDENZE DI CAMPO DELL'EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE PER BRONCHITE INFETTIVA CON CEPPI MASS E QX NEI CONFRONTI DELL'INFEZIONE DA CEPPI DI CAMPO DI GENOTIPO Q1.**

Russo E.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Tucciarone C.M.<sup>2</sup>, Longoni C.<sup>1</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)*

## **Summary**

Infectious bronchitis virus (IBV) is an highly contagious Avian Coronavirus, and causes respiratory symptoms and serious economic losses for the worldwide chicken industry. In Northern Italy the prevalent strain is QX, and many farms vaccinated with the association of Mass and QX strains.

A monitoring program was carried out in some farms vaccinated with a Mass strain at the hatchery and Nobilis IB Primo QX spray in field at day 1. A farm with previous QX strains isolation was selected, and two consequent cycles were monitored. Tracheal and cloacal swabs were collected at 5, 8, 12, 15, 19, 23, 29, 37, 43, 50 and 57 days from 10 birds, and blood samples were collected since 15 days, every week, from 20 birds.

The swabs were processed in pool and 2 real time PCR specific for the two vaccines were conducted. An test HI was performed on blood samples for the titration of antibodies against IBV QX, Mass and 793B strains, in the second cycle Q1 was added. During the first cycle the birds showed mild respiratory symptoms at day 16 for 24h, no mortality was present and no treatment was required, and around day 43 for a couple of days, with presence of swollen head syndrome and mortality. A PCR for IBV and aMPV was conducted on swabs collected at days 15, 43 and 50, and sequencing for IBV positive samples was carried out. IBV Q1 strain was detected at days 15 and 50 and aMPV was detected at day 50. During the second cycle no symptoms were detected, but the presence of two peak in serology suggested the presence of field infection and IBV field QX strain was identified at day 29 and 36.

In this case the vaccination with a Mass strain associated with a QX was effective not only for the control of a IBV QX strain infection, but also against IBV Q1 strain infection. Further studies in laboratory with known challenge will be necessary to confirm this result.

## **INTRODUZIONE**

Il virus della Bronchite Infettiva (IBV) appartiene alla famiglia Coronaviridae, genere Coronavirus. Questo virus causa una infezione del tratto respiratorio che viene spesso complicata da patogeni secondari quali causando ingenti perdite economiche. Una delle caratteristiche principali di questo virus è la spiccata variabilità antigenica dovuta ad un tasso elevato di mutazioni genetiche. Nel corso degli anni sono stati isolati numerosi ceppi di IBV appartenenti a genotipi differenti con diffusione e prevalenza variabile a seconda dell'area geografica.<sup>1</sup>

Il sistema di controllo maggiormente utilizzato per questa patologia è la vaccinazione. Tra genotipi antigenicamente diversi non c'è cross-protezione, tuttavia l'associazione di vaccini appartenenti a genotipi differenti permette un ampliamento dello spettro di protezione secondo un concetto chiamato "protectotipo".<sup>2</sup>

Il genotipo di IBV attualmente prevalente in Italia è il QX, seguito da 793B, Mass e Q1.<sup>3</sup> I piani vaccinali maggiormente utilizzati nei broiler prevedono l'associazione di Mass e 793/B, di dimostrata efficacia nella protezione sia per QX che per Q1, e l'associazione di Mass e QX, per cui non sono presenti dati relativi alla cross-protezione.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Nel presente studio è stato sottoposto a campionamento un allevamento di broiler per due cicli produttivi successivi (luglio-settembre 2015 e settembre-novembre 2015).

Gli animali sono stati tutti sottoposti a due vaccinazioni spray per IBV: la prima in incubatoio con ceppo appartenente al genotipo Mass, la seconda all'arrivo in allevamento, ad 1 giorno di vita con vaccino Nobilis IB Primo QX (ceppo D388, genotipo QX).

Gli animali dell'allevamento oggetto di studio sono stati campionati mediante tamponi tracheali e cloacali per indagini molecolari ai giorni: 8, 12, 15, 19, 23, 29, 37, 43, 50 e 57 nel primo ciclo, e nei giorni 5, 8, 12, 15, 19, 22, 29, 36, 43, 51 e 57 nel secondo ciclo. Per il monitoraggio sierologico in entrambi i cicli sono stati effettuati prelievi settimanali a partire dalle 2 settimane di età.

Gli animali sono inoltre stati monitorati clinicamente durante tutto il ciclo per rilevare la presenza di sintomatologia respiratoria.

### *Analisi molecolari*

Il campionamento ha previsto la raccolta di 10 tamponi tracheali e 10 tamponi cloacali da far asciugare per 10 minuti all'aria allo scopo di limitare la crescita di batteri e/o muffe e mantenuti a temperatura ambiente sino all'invio in laboratorio di virologia del Dipartimento MAPS (tempo sempre inferiore alle 48h).

I tamponi sono stati analizzati in *pool* costituiti sulla base del momento e del sito di prelievo. L'RNA estratto mediante Kit del commercio è stato sottoposto a due Real-time RT-PCR disegnate e validate (in termini di sensibilità e specificità) per questo studio. Una di queste è specifica per i ceppi IBV genotipo QX presenti nei due vaccini attualmente commercializzati in Italia. Non è invece in grado di amplificare ceppi QX di campo italiani.

A partire da virus IBV del genotipo ricercato è stata prodotta per ciascuna Real-time RT-PCR una curva standard di calibrazione in modo da poter poi quantificare i campioni oggetto dell'indagine. Per il genotipo QX è stato utilizzato il vaccino Nobilis IB Primo QX che ha mostrato un titolo su organocolture di anelli tracheali di pollo di 105.83CID50/ml mentre per il genotipo Mass è stato utilizzato un ceppo di campo in nostro possesso con un titolo di 105.5CID50/ml.

Inoltre quando riscontrata sintomatologia respiratoria, o in corrispondenza dei 15

giorni precedenti a marcati rialzi anticorpali per IBV, è stata effettuata una PCR generica per IBV<sup>4</sup> seguita da sequenziamento per l'individuazione di ceppi di IBV di campo e, in caso di sintomatologia respiratoria una real-time RT-PCR per aMPV in grado di evidenziare e differenziare aMPV sottotipo A e B<sup>5</sup>.

### Analisi sierologiche

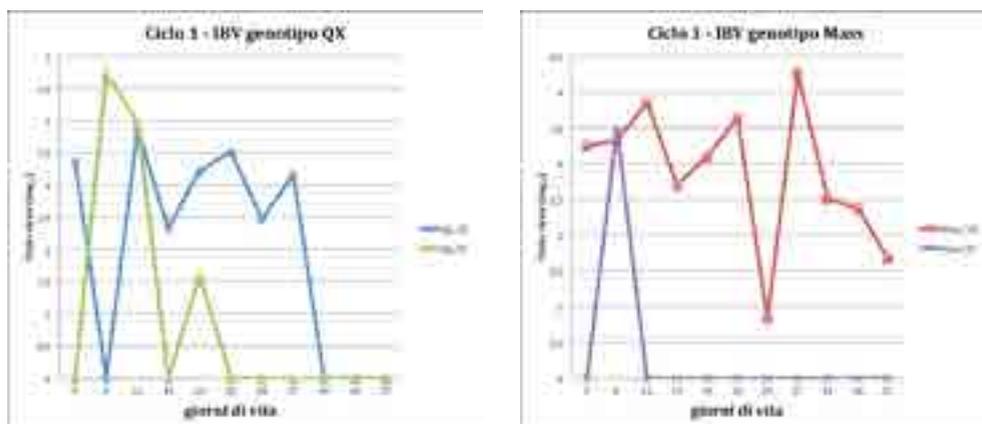
Per ogni allevamento e tempo di campionamento sono stati effettuati 20 prelievi di sangue, fatti sierare e consegnati per le analisi all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie. Su ogni siero è stata fatta una quantificazione degli anticorpi per Bronchite Infettiva varianti Mass, 793/B, QX e Q1 in mediante inibizione della sieroagglutinazione (HI).

## RISULTATI

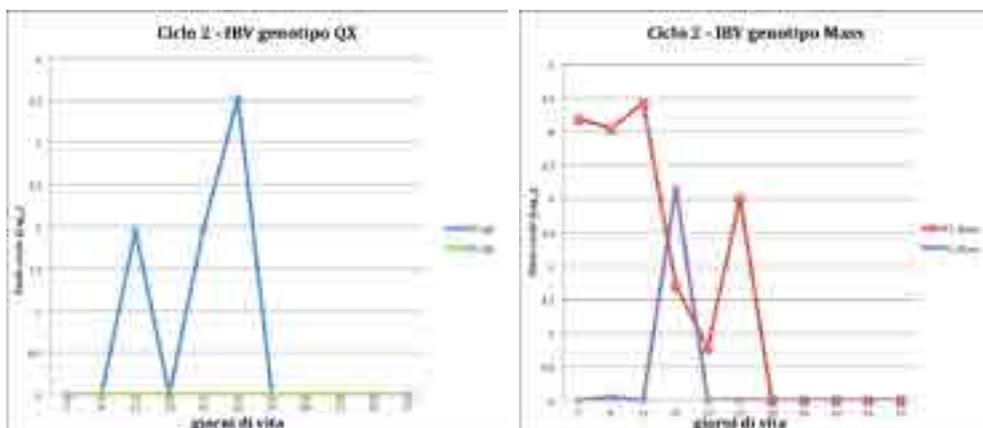
Nelle Figure 1 e 2 vengono riportati i risultati delle due real-time RT-PCR per IBV. Si può osservare come tutti i campioni dell'apparato respiratorio (tamponi tracheali) del primo ciclo produttivo monitorato sono risultati positivi alla Real-time RT-PCR specifica per Mass mentre tutti i pool dei tamponi cloacali, ad eccezione di quello prelevato a 8 giorni, sono risultati negativi a IBV Mass. Nel secondo ciclo produttivo tutti i campioni tracheali prelevati sino al 29° giorno e quelli cloacali prelevati dal 5° al 15° sono risultati positivi per IBV Mass. I campioni cloacali prelevati al 5°, 8° e 12° giorno hanno mostrato titoli virali molto bassi come si può osservare nella Figura 2.

Sono state riscontrate minori positività per IBV QX. I campioni dell'apparato respiratorio prelevati nel primo ciclo monitorato al 5° giorno e quelli dal 12° al 37° e nel secondo ciclo all'8°, 15° e 19°, sono risultati positivi. IBV genotipo QX è stato riscontrato in pool di tamponi cloacali prelevati all'8°, 12° e 19° giorno nel primo ciclo produttivo monitorato e al 19° giorno nel secondo ciclo produttivo.

**Figura 1.** Risultati delle Real-time RT-PCRs specifiche per IBV genotipo QX (a sinistra) e genotipo Mass (a destra) effettuate sui tamponi tracheali (TT) e cloacali (TC) del primo ciclo produttivo monitorato.



**Figura 2.** Risultati delle Real-time RT-PCR specifiche per IBV genotipo QX (a sinistra) e genotipo Mass (a destra) effettuate sui tamponi tracheali (TT) e cloacali (TC) del secondo ciclo produttivo monitorato.



L'esame clinico del primo ciclo ha evidenziato una forma respiratoria molto lieve a 15 giorni regredita senza bisogno di utilizzare antibiotici, e a 50 giorni una forma respiratoria accompagnata da sindrome della testa gonfia e rialzo di mortalità. Nel corso del secondo ciclo non sono stati riscontrati sintomi respiratori.

I pool dei tamponi tracheali dei giorni 15 e 50 del primo ciclo e quelli dei giorni 5, 8, 12, 29 e 36 del secondo ciclo sono stati sottoposti a PCR generica per IBV e sequenziamento. Nel primo ciclo produttivo è stato possibile amplificare e sequenziare IBV genotipo Q1 da campioni prelevati al 15° e 50° giorno di età degli animali. Nel secondo ciclo monitorato, IBV genotipo QX è stato rilevato da tamponi tracheali prelevati a 29 e 36 giorni, mentre i tamponi prelevati a 5, 8 e 12 giorni sono risultati positivi per IBV genotipo Mass.

A 43 giorni nel primo ciclo è stato evidenziato, mediante real-time RT-PCR, aMPV sottotipo B ad alti titoli virali.

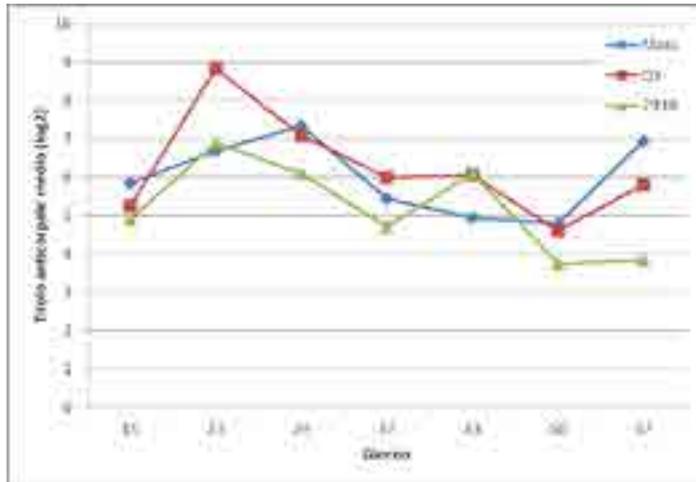
In Figura 3 e 4 vengono riportati i risultati delle analisi sierologiche effettuate durante il primo e il secondo ciclo.

Nel primo ciclo si può notare che già a 15 giorni gli animali avevano sierconvertito con un titolo anticorpale compatibile con la vaccinazione con vaccini del ceppo Mass e QX, i titoli per 793/B sono da considerarsi un trascinarsi. Il livello medio dei titoli anticorpali per le varianti per cui è vaccinato (Mass e QX) si è sempre mantenuto al di sopra del limite di positività (1:16, 4 nel grafico log2). Il picco a 23 giorni è conseguente all'infezione da IBV di campo ceppo Q1.

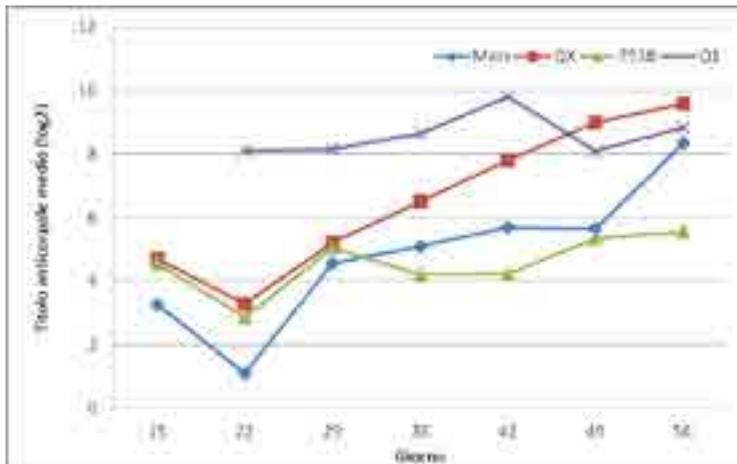
Nel secondo ciclo è presente una sierconversione molto elevata per Q1 già dal 22° giorno, che sembrerebbe indicare una infezione da IBV genotipo Q1 che però non è stato evidenziato dalle analisi molecolari.

L'infezione da IBV ceppo QX causa il marcato rialzo anticorpale per QX da giorno 36 in poi.

**Figura 3.** Risultati della HI effettuata sui sieri per IB genotipo Mass, 793/B e QX nel corso del primo ciclo.



**Figura 4.** Risultati della HI effettuata sui sieri per IB genotipo Mass, 793/B, QX e Q1 nel corso del secondo ciclo.



### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo monitoraggio ha permesso di evidenziare la replicazione e la persistenza di entrambi i vaccini impiegati (Mass e QX) a livello tracheale anche quando somministrati entrambi ad 1 giorno di vita. A livello cloacale invece la replicazione si è dimostrata scarsa per entrambi i vaccini.

I risultati sierologici hanno evidenziato come la vaccinazione con due ceppi differenti (in questo caso Mass e QX) determini non solo lo sviluppo di buoni titoli anticorpali

nei confronti dei genotipi utilizzati per la vaccinazione, ma anche un innalzamento per trascinarsi del titolo relativo ad altre varianti (793/B) con cui gli animali non sono venuti a contatto.

Da un punto di vista di efficacia del piano vaccinale impiegato, l'associazione di Mass e QX si è dimostrata efficace nel garantire protezione non solo dal genotipo QX, che è stato isolato durante il secondo ciclo in assenza di sintomatologia, ma anche dal genotipo Q1. A seguito dell'infezione da IBV genotipo Q1 infatti si è rilevata solo una sintomatologia molto lieve che non ha richiesto l'impiego di farmaci e non ha inciso sul consumo alimentare degli animali. Questo dato sembra indicare che il concetto del "protectotipo", secondo il quale la vaccinazione con due genotipi diversi di IBV permette l'ampliamento dello spettro di protezione anche ad altri genotipi, già dimostrato per l'associazione Mass-793/B<sup>2</sup>, possa essere valido anche per altre associazioni come Mass-QX. Questo dato è fondamentale per la definizione dei possibili piani vaccinali da impiegare in un'area, come il Nord Italia, dove è presente un genotipo (Q1) per cui non sono stati sviluppati vaccini omologhi e che quindi va controllato mediante vaccinazione con associazione di genotipi diversi. Questo dato andrà in futuro confermato con studi sperimentali specifici effettuati in laboratorio.

Una sintomatologia respiratoria rilevante si è riscontrata nel corso dei due cicli solo in concomitanza dell'infezione da aMPV, e in presenza di segni clinici (teste gonfie) tipici delle forme respiratorie causate da questo patogeno.

In conclusione durante questo monitoraggio si è evidenziata l'efficacia del piano vaccinale che impiega i vaccini IBV Mass e QX per il controllo delle infezioni da IBV di campo genotipi QX e Q1.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Jackwood MD 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.
2. Cook JKA, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology* 28: 477-485
3. Massi P, Barbieri I, Fiorentini L, Casadio M, Parigi M, Tosi G. (2015). Analisi molecolare di ceppi del virus della Bronchite Infettiva Aviaria negli anni 2013 e 2014. Considerazioni sui genotipi circolanti in Italia e in altri paesi europei ed extra-europei. *Atti SIPA 2015* pp. 220-229.
4. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., C.J. Naylor C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28(6): 593-605.
5. Cecchinato M., Lupini C., Munoz Pogoreltseva O.S., Listorti V., Mondin A., Drigo M., Catelli E. (2013). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathology*, 42(3):283-289.

## I CORVIDI QUALI SPECIE SENTINELLA PER LE AVIAN EMERGING DISEASES IN ROMAGNA

Scaravelli D., Tosi G., Fiorentini L., Parigi M., Caminiti A., Massi P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna "Bruno Ubertini", Sezione di Forlì, Via Don E. Servadei 3/5, 47100 Forlì, Italy*

### Summary

Among wild birds three species of Corvids, Magpie *Pica pica*, Hooded crow *Corvus corone cornix* and Jay *Garrulus glandarius* were used as sentinel species for the presences of Flavivirus, West Nile, Usutu and Newcastle viruses in the territories of Ravenna, Rimini and Forlì Provinces, the Romagna area, during year 2013-2015 as part of the comprehensive monitoring effort going on in Lombardia and Emilia Romagna regions by Istituto Zooprofilattico Sperimentale sections. The three corvids confirm they role as potential host for the different virus. Hooded crown have 1,2% positive sample in 2014 for Flavivirus, any positive for Newcastle, 1,2% positive for Usutu in 2014 as well as 1,2% positive in 2014 for West Nile virus. Magpie was positive all the years for Flavivirus reaching the 23% of positive in 2015, any positive for Newcastle, till 7% of positive for Usutu and 3,7 positive for West Nile virus. Jay reach 10% of positive for Flavivirus as well for Usutu, but had no positive for Newcastle and West Nile virus. The species differ for susceptibility and dissemination among years and can represent a better model if the collection and transfer procedures will be improved and more precisely configured with the territory.

### INTRODUZIONE

Tra le *emerging diseases* che negli ultimi anni hanno creato attenzione nell'Europa mediterranea come in tante altre parti del mondo un ruolo davvero incisivo stanno avendo oltre all'Influenza aviaria anche West Nile, Usutu, Flavivirus e Malattia di Newcastle (e.g. Cazolari et al., 2010 e 2013; Pradier et al., 2012; Di Sabatino et al., 2014) anche in relazione al complicarsi dello scenario relativo ai vettori (e.g. Bellini et al., 2014). Fondamentale è stato quindi promuovere l'istituzione di un piano di monitoraggio sanitario su tutto il territorio italiano (Barzon et al., 2013; Angelini et al., 2010). Tra le specie che possono ricoprire il ruolo di sentinella sul territorio troviamo al primo posto alcuni rappresentanti della famiglia dei Corvidae (eg. Jourdain et al., 2007 e 2008). In particolare la gazza *Pica pica* e la Cornacchia grigia *Corvus corone cornix* sono specie abbondanti su tutto il territorio nazionale. In Emilia Romagna il piano prevede anche il possibile conferimento di Ghiandaia *Garrulus glandarius*.

Oltre alla sorveglianza passiva sull'avifauna riscontrata morta si sta operando una azione attiva campionando i corvidi abbattuti durante l'attività venatoria o nei piani di controllo numerico su queste specie predisposti dalle Province. Questi prelievi sono operati da maggio a ottobre nei territori di pianura e collina della Regione. Sono preferiti i giovani dell'anno che vengono consegnati immediatamente o a seguito di refrigerazione all'Istituto, con una scheda indicante provenienza,

data e responsabili degli abbattimenti. Scopo di questo lavoro è presentare i risultati conseguiti per l'area romagnola, tra le più sensibili e attive zone di produzione avicola del paese, per quanto attiene i campionamenti ottenuti sulle specie sentinella.

## **MATERIALI E METODI**

Sono stati analizzati gli esiti delle indagini sulla presenza dei virus West Nile, Usutu, Flavivirus e Malattia di Newcastle mediante RT-PCR con le procedure consolidate nella pratica ispettiva operata dall'Istituto su esemplari di Gazza, Cornacchia grigia e Ghiandaia provenienti dalle province di Ravenna, Forlì e Rimini. Gli esemplari sono spesso stati raccolti in pool da 20, quando provenissero dallo stesso luogo e data di cattura, quindi il numero complessivo di esemplari conferiti è superiore a quanto sotto riportato, utilizzando per i calcoli i singoli risultati di laboratorio.

## **RISULTATI**

Nei tre anni considerati sono stati verificati 104 campioni di Cornacchia grigia in Romagna e le ricerche di Flavivirus nei 3 anni considerati sono state 103 (10,3% del totale delle sezioni di entrambe le regioni) con un solo caso positivo nel 2014 mentre la prevalenza generale ha visto valori tra 1,9 e 12% su un totale di 997 esemplari. Per la malattia di Newcastle i campioni verificati sono stati 83 (13% del totale) senza mai un riscontro positivo. Solo nel 2014 per contro si sono avute positività minime nel resto delle regioni.

Per il virus Usutu sono stati controllati 103 campioni (10,2% del totale) con un solo caso positivo nel 2014. Se il 2013 non ha avuto positività, nel biennio 2014 e anche nel 2015 si sono avute prevalenze dello 0,2 e 0,7% nel resto del territorio

Molto simile la situazione per West Nile Virus con un solo caso positivo nel 2014, mentre nel rimanente territorio le prevalenze sono state dell'8,3, 1,9 e 1,7 nei tre anni su 1742 campioni.

Per la Gazza in complesso sono stati verificati 169 casi. Le prevalenze su 140 campioni (8,7% del totale) per i Flavivirus sono state 6,5% nel 2013, 1,2% nel 2014 e 23% nel 2015. Risultano elevate anche nel resto della Regione e in Lombardia con 10,5, 1,9 e 11,3% di positivi nei tre anni.

Nessun caso positivo per il virus di Newcastle in 123 campioni e prevalenze molto basse anche nel resto del territorio. Per il virus Usutu i casi positivi su 169 campioni (10,2% del totale) sono stati del 4,35, 1,23 e 7,14% nei tre anni considerati mentre nel resto del territorio sono arrivati appena a 1,78, 0,17 e 2,18% rispettivamente. Per quanto attiene il West Nile Virus su 159 campioni (7,7 % del totale) si sono avute positività solo per 2014 e 2015 con 3,77 e 1,23% rispettivamente, mentre sul resto de territorio i positivi sono stati del 9,79, 1,88 e 6,88% nei tre anni

La Ghiandaia è stata campionata solo in Emilia Romagna e il confronto quindi è tra le due parti della stessa regione. Per i Flavivirus in Romagna le positività accertate su 105 casi sono del 10 e 4 % rispettivamente nel 2014 e 2015, mentre in Emilia tutti e tre gli anni hanno dato positività che hanno raggiunto 3, 2,7 e 4,3 rispettivamente. Anche il virus Usutu in Romagna è stato trovato negli stessi anni con il 10 e il 4% di positivi mentre in Emilia sono stati trovati il 3% di casi positivi nel 2013 e 4,35% nel 2015. Per il West Nile Virus sono state verificati 99 casi di Ghiandaia (31% del totale) senza trovare alcuna positività, mentre al contrario sono state del 2,4, 1,2 e 1,1% dal 2013 al 2015 in Emilia.

## CONCLUSIONI

In definitiva le tre specie hanno dato risultati di interesse per il riscontro dei diversi virus consolidando il loro ruolo come specie sentinella. Le prevalenze sono comunque basse e delineano una presenza diffusa dei virus in Romagna con casistiche che si discostano o allineano con il resto dei territori regionali, a dimostrazione di come sia complessa l'interazione tra specie ospiti, vettori e riserve selvatiche per questi virus. Si rileva come il sistema di controllo sul territorio sia comunque da perfezionare in quanto manca la localizzazione precisa dei prelievi e una loro consegna in tempi e modalità adeguate agli istituti, con successiva mancanza di precisione nell'analisi per territori e nella possibilità di collegarla al meglio con i riscontri che si ottengono su vettori o nel caso con i riscontri che avvengono su altre specie selvatiche e sui domestici (Calzolari et al., 2015) anche in collegamento con i cambiamenti climatici globali (Marcantonio et al, 2015; Paz, 2015).

## BIBLIOGRAFIA

- Angelini P, Tamba M, Finarelli AC, Bellini R, Albieri A, Bonilauri P, et al. 2010. West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill.* 2010; 15(16).
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Lavezzo E, Cattai M, et al. 2013- The complex epidemiological scenario of West Nile virus in Italy. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10(10): 4669–4689. doi: 10.3390/ijerph10104669
- Bellini R, Calzolari M, Mattivi A, Tamba M, Angelini P, Bonilauri P, et al. 2014. The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013. *Euro Surveill.* 2014; 19(44).
- Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, et al. 2010. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One* 2010; 5(12).
- Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Tamba M, et al. 2013. Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna region (Italy) in 2011. *PLoS One*; 8(5).
- Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, Defilippo F, Pierro A, Albieri A, et al. 2012. Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS One* 2012; 7(5).
- Calzolari M, Pautasso A, Montarsi F, Albieri A, Bellini R, Bonilauri P, et al., 2015. West Nile Virus Surveillance in 2013 via Mosquito Screening in Northern Italy and the Influence of Weather on Virus Circulation. *PLoS ONE* 10(10): e0140915. doi:10.1371/journal.pone.0140915
- Di Sabatino D., R. Bruno, F. Sauro, M.L. Danzetta, F. Cito, S. Iannetti, V. Narcisi, F. De Massis, P. Calistri, 2014. Epidemiology of West Nile Disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013. *BioMed Research International* ID 907852, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/907852>.
- Jourdain E, Toussaint Y, Leblond A, Bicout DJ, Sabatier P, Gauthier-Clerc M., 2007. Bird species potentially involved in introduction, amplification and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7:15–33.

- Jourdain E., Gauthier-Clerc M., Sabatier P., Grége O., Greenland T., Leblond A., Lafaye M., Zelle H. G., 2008 Magpies as Hosts for West Nile Virus, Southern France. *Emerging Infectious disease* 14 (1): 158-160
- Marcantonio M, Rizzoli A, Metz M, Rosà R, Marini G, Chadwick E, et al. 2015; identifying the environmental conditions favouring West Nile Virus outbreaks in Europe. *PLoS One* 10(3): e0121158. doi: 10.1371/journal.pone.0121158
- Paz S., 2015. Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. *Philos Trans R Soc. Lond B Biol Sci.* 2015; 370 (1665).
- Pradier S., S. Lecollinet, A. Leblond, 2012. West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 31 (3), 829-844.

## EVIDENZA DI GAMMA E DELTACORONAVIRUS IN ALLEVAMENTI DI QUAGLIE E FAGIANI IN ITALIA

Torres C.A.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>2</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>, Franzo G.<sup>3</sup>, Drigo M.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>, Brandão P.E.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, College of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando, Marques de Paiva, 87, CEP 05508 270, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia (BO) - Italia.

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD) - Italia.

### Summary

On the view of the restricted knowledge on the diversity of coronaviruses in poultry other than chicken, this study aimed to investigate the molecular diversity of coronaviruses in quail, pheasant and partridge from two regions of Northern Italy. For these purpose, pools of tracheal and cloacal swabs from European quail (*Coturnix coturnix*), and intestinal tract of pheasants (*Phasianus colchicus*) and partridge (*Perdix perdix*) flocks, with or without enteric signs, were collected during 2015. An Avian coronavirus (*Gammacoronavirus*) was detected in quails not vaccinated against Infectious Bronchitis Virus (IBV) and pheasant vaccinated with an IBV Massachusetts serotype. Based on DNA sequences for the gene encoding the S protein, the avian coronaviruses detected in the quail and pheasant are related to the IBV 793B and Massachusetts types, respectively. However, RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) analyses showed the susceptibility of quail also to Deltacoronaviruses, suggesting that quail and pheasant avian coronaviruses share spike genes identical to chicken IBV spike genes and quail might host *Deltacoronavirus*.

### INTRODUZIONE

I Coronavirus (CoV) sono virus con genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva appartenenti all'ordine *Nidovirales*, famiglia *Coronaviridae*, sottofamiglia *Coronavirinae*. I CoV sono comunemente classificati in 4 generi: *Alphacoronavirus* ( $\alpha$ -CoV) e *Betacoronavirus* ( $\beta$ -CoV) infettano molte specie di mammiferi, dai pipistrelli all'uomo (Chan et al., 2013), *Gammacoronavirus* ( $\gamma$ -CoV) e *Deltacoronavirus* ( $\delta$ -CoV) sono molto diffusi nelle specie aviari e sono stati riportati in maniera sporadica nei mammiferi (Woo et al., 2010; Woo et al., 2012; ICTV, 2014; Fehr e Perlman, 2015). Il Coronavirus aviare conosciuto anche come virus della Bronchite Infettiva del pollo (IBV), è un *Gammacoronavirus* in grado di replicare negli epiteli degli apparati respiratorio, riproduttivo, urinario ed enterico (Cavanagh, 2003; Cavanagh, 2005; Villareal et al., 2007). Ceppi di IBV e IBV-like sono stati isolati nel pollo, nel tacchino e in molte altre specie di uccelli come oche, anatre, piccioni, fagiani (Cavanagh et al., 2002) e quaglie (Circella et al., 2007; Torres et al., 2013), in alcuni casi in assenza di sintomatologia clinica (Cavanagh, 2005), suggerendo la possibilità che tali specie possano fungere da *reservoir* per IBV (de Wit et al., 2011). Ceppi virali

classificati come *Deltacoronavirus* (de Groot et al., 2012), sono stati identificati in uccelli selvatici (Woo et al., 2009; Chu et al., 2011; Durães-Carvalho et al., 2015). Pochi sono i dati disponibili sui coronavirus isolati in specie aviari differenti dal pollo. Il presente lavoro mira a contribuire ad una maggiore conoscenza delle caratteristiche genetiche di tali virus circolanti in allevamenti di quaglie, fagiani e starne.

## **MATERIALI E METODI**

### *Allevamenti*

L'indagine è stata condotta, durante il 2015, in 10 allevamenti ed ha interessato 17 gruppi di quaglie, 8 di fagiani e 2 di starne. Le caratteristiche dei gruppi, i programmi vaccinali applicati e i dettagli relativi ai campionamenti eseguiti sono riportati in tabella 1. Tutti gli allevamenti inclusi nello studio erano localizzati in nord Italia, in particolare in Veneto ed Emilia-Romagna, che sono considerate zone ad elevata densità di allevamenti avicoli. Tutti i gruppi sono stati monitorati durante l'intero ciclo produttivo per valutare l'eventuale presenza di sintomatologia respiratoria o enterica.

### *Campionamenti*

In alcuni gruppi sono stati eseguiti 10 tamponi tracheali e 10 tamponi cloacali ed in altri sono stati prelevati tratti di intestino (5 animali/gruppo). I tamponi sono stati fatti asciugare all'aria per 15 minuti, prima della conservazione a -80°C. Tutti i campioni sono stati processati in pool per indagini molecolari di seguito riportate.

### *Estrazione dell'RNA virale*

I pool dei tamponi tracheali e cloacali di ciascun gruppo sono stati eluiti in 2 ml di PBS sterile ed i pool degli intestini sono stati preparati come sospensione 50% P/V in PBS e centrifugati a 12.000 x g per 15 minuti a 10°C. L'RNA è stato estratto da 200 µl di eluito o di surnatante utilizzando l'High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Monza, Italia) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

### *One step RT-Nested PCR di screening per IBV*

Tutti i pool sono stati sottoposti ad una *One step RT-Nested PCR* di screening per Coronavirus aviare, che amplifica la regione 3'- *untranslated region* (UTR), come descritto da Cavanagh et al., (2002). Per questa reazione sono stati utilizzati gli enzimi SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

### *Analisi dei geni codificanti per l'RNA polimerasi RNA dipendente (RpRd) e per la proteina dello spike (S).*

I pool positivi alla *One step RT-Nested PCR* di screening per Coronavirus aviare sono stati successivamente testati utilizzando i seguenti protocolli:

- una *Nested-Multiplex RT-PCR* che amplifica una porzione del gene S, capace di individuare e discriminare i genotipi di IBV 793/B, D274 e Massachusetts (Cavanagh et al., 1999);
- una RT-PCR generica capace di amplificare la regione codificante per la RpRd di tutti i coronavirus (Chu et al., 2011);
- una RT-PCR generica per IBV diretta su una porzione del gene S, descritta da Worthington et al., (2008).

Tutti i protocolli di RT-PCR sono stati eseguiti utilizzando gli enzimi SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Gli amplificati sono stati inviati alla MacroGen Europe per il sequenziamento tramite metodo Sanger. Tutti i cromatogrammi sono stati analizzati manualmente utilizzando il programma *Finch TV* 1.4.0. (© 2004-2006 Geospiza Inc). Le sequenze di ogni campione sono state ottenute utilizzando l'applicazione *Consensus* del software *BioEdit* 7.0.9.0 (Tom Hall © 1997-2007) allineandole con una sequenza di riferimento scaricata da *GenBank* (*accession numbers* nelle figure 1 e 2), utilizzando il programma *Clustal/W multiple alignment* dello stesso software. Gli alberi filogenetici sono stati realizzati sulle sequenze nucleotidiche di parte dei geni S ed RpRd utilizzando il software *MEGA* 5.2.1. (*Maximum Composite Likelihood model* con valore di *bootstrap* 1000) (Tamura et al., 2011).

## RISULTATI

Quindici gruppi (9 di quaglie e 6 di fagiani) di 7 allevamenti (F1, F2, F4, F5, F6, F7 ed F8) sono risultati positivi alla *One step RT-Nested PCR* di screening per i Coronavirus aviari. I Campioni ottenuti dalle starnie sono tutti risultati negativi. È stato possibile amplificare parte del gene S di alcuni dei campioni risultati positivi allo screening, con la *Nested-Multiplex RT-PCR*, per una prima genotipizzazione. I risultati di tale analisi hanno premesso di classificare gli amplificati ottenuti dalle quaglie come appartenenti al genotipo 793B e quelli ottenuti dai fagiani, al genotipo Massachusetts. I campioni da cui è stato possibile, poi, amplificare le regioni RpRd ed S del genoma, con le altre metodiche descritte, sono riportati in tabella 2. Dopo sequenziamento di questi amplificati, sono stati costruiti gli alberi filogenetici. L'albero filogenetico del gene che codifica per la RpRd (figura 1) mostra come tutte le sequenze ottenute delle quaglie clusterizzano con il genere  $\delta$ -CoV. L'identità nucleotidica tra le sequenze dei ceppi delle quaglie e, rispettivamente, le sequenze del *Deltacoronavirus* B04 (*GenBank accession number* KP965434) (Durães-Carvalho et al., 2015) e del *Porcine Deltacoronavirus* è del 92.5% e dell'86%. Inoltre sono stati identificati, nel cluster delle sequenze dei *Deltacoronavirus* delle quaglie, 3 subclusters, con un'identità nucleotidica media del 95.89%, indicativi della presenza di differenti popolazioni virali. I ceppi di coronavirus evidenziati nei fagiani (figura 1) clusterizzano con il genere  $\gamma$ -CoV, presentando tra loro un'identità nucleotidica del 100%. L'albero filogenetico basato sulle sequenze nucleotidiche del gene S (figura 2) ha confermato i risultati ottenuti dalla *Nested-Multiplex RT-PCR*. Tutti i ceppi ottenuti dalle quaglie clusterizzano con ceppi IBV genotipo 793B (con un'identità nucleotidica media del 97%). Di questi ceppi, due (*GenBank accession numbers* KX077963 e KX077961) presentano un'identità nucleotidica media del 99.4% con un ceppo vaccinale di IBV genotipo 793B ampiamente utilizzato in Italia. I ceppi ottenuti dai fagiani clusterizzano con il genotipo Massachusetts con un'identità nucleotidica del 99%.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro sono state investigate la presenza e le caratteristiche molecolari di coronavirus in quaglie, fagiani e starnie in nord Italia. Questo ha permesso l'individuazione nelle quaglie di ceppi di Coronavirus aviari correlati nella porzione genica

che codifica per la proteina S, con IBV genotipo 793B e nei fagiani con il genotipo Massachusetts. Anche l'analisi filogenetica di parte della stessa regione, suggerisce la circolazione del genotipo 793B nelle quaglie. Questo genotipo, dopo la sua prima apparizione negli anni '90 (Gough et al., 1992) è diventato tra i più diffusi in Europa (Worthington et al., 2008). Non si può escludere l'origine vaccinale dei ceppi virali che sono stati individuati nelle quaglie durante questo studio, perché vaccini appartenenti a tale genotipo vengono ampiamente utilizzati in Italia e perché i protocolli diagnostici disponibili non ci permettono di distinguere inequivocabilmente tra ceppi di campo e vaccinali. Inoltre, un recente studio ha messo in evidenza come i ceppi di IBV 793B identificati in Italia sembrano tutti derivare dai ceppi 793B vaccinali in uso (Franzo et al., 2014). A supporto di tale ipotesi, in questo studio, è stato osservato che 2 ceppi genotipo 793B, identificati in gruppi di quaglie di un allevamento in cui erano presenti anche dei galletti vaccinati con lo stesso genotipo, presentano una elevata omologia con il vaccino applicato in quest'ultimi. I ceppi virali ottenuti dai fagiani clusterizzano con ceppi di IBV genotipo Massachusetts. Considerando che i fagiani campionati erano stati vaccinati con un ceppo vaccinale dello stesso genotipo e che questo può essere evidenziato negli animali per settimane dopo la vaccinazione (Cavanagh et al., 1999), c'è il sospetto che anche in questo caso i ceppi di IBV identificati siano di origine vaccinale. Sulla base dell'analisi delle sequenze della regione genica dell'RpRd, i ceppi di IBV identificati nei fagiani clusterizzano con ceppi appartenenti al genere  $\gamma$ -CoV, mentre sorprendentemente i ceppi di coronavirus delle quaglie clusterizzano con i  $\delta$ -CoV. Tendendo conto della discrepanza di collocazione tassonomica dei ceppi identificati nelle quaglie in base ai risultati dell'analisi filogenetica delle regioni RpRd ed S (*Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* rispettivamente) è possibile ipotizzare che ci sia la co-circolazione in questa specie di virus appartenenti ad entrambi i generi e non sono da escludere fenomeni di ricombinazione. La ricombinazione tra ceppi di generi diversi dei coronavirus, inizialmente ipotizzata all'origine del coronavirus causa della *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), sembra però improbabile in natura (Thor et al., 2011; Woo et al., 2010). Ulteriori indagini sulla sequenza completa dei virus identificati nelle quaglie in questo studio, utilizzando protocolli di *Next Generation Sequencing*, potrebbero dare maggiori informazioni sulle caratteristiche e sull'origine di questi virus. Inoltre, il loro isolamento e l'inoculazione, in condizione sperimentali, in quaglie potrebbero confermare la sensibilità di questa specie all'infezione da  $\delta$ -CoV.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology*, 32: 567-582.
2. Cavanagh D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, 34: 439-448.
3. Cavanagh D, Mawditt K, Welchmand Dde B, Britton P, Gough RE. (2002). Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (Infectious Bronchitis Virus) and turkeys. *Avian Pathology*, 31: 81-93.
4. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor CJ. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28: 593-605.

5. Chan JF, To KK, Tse H, Jin HDY, Yuen KY. (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends in Microbiology*, 21: 544-555.
6. Chu DK, Leung CY, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tse TM, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. (2011). Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of Virology*, 85: 12815-12820.
7. Circella E, Camarda A, Martella V, Bruni G, Lavazza A, Buonavoglia C. (2007). Coronavirus associated with an enteric syndrome on a quail farm. *Avian Pathology*, 36: 251-258.
8. De Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, Poon L, Rottier PJM Talbot PJ, Woo PC, Ziebuhr J. (2012). Family Coronaviridae In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. King A, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EF, (Eds). Elsevier, Amsterdam, NL, pp. 806-828.
9. de Wit JJ, Cook JKA, van der Heijden HMJF. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology*, 40: 223-235.
10. Durães-Carvalho RL, Caserta C, Barnab ACS, Martini MC, Ferreira HL, P. A. N. Felipe PAN, Santos MB, Arns CW. (2015). Coronaviruses Detected in Brazilian Wild Birds Reveal Close Evolutionary Relationships with Beta- and Deltacoronaviruses Isolated From Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 81: 21-23.
11. Fehr AR e Perlman S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1282: 1-23.
12. Franzo G, Naylor CJ, Lupini C, Drigo M, Catelli E, Listorti V, Pesente P, Giovanardi D, Morandini E, Cecchinato M. (2014). Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine*, 32: 6765-6767.
13. Gough RE, Randall CJ, Dagless M, Alexander DJ, Cox WJ, Pearson D. (1992). A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record*, 130: 493-494.
14. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar MS. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
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. Torres CA, Villarreal LYB, Ayres GGR, Richtzenhain L, Brandão PE. (2013). An Avian Coronavirus in Quail with Respiratory and Reproductive Signs. *Avian Diseases*, 57: 295-299.
17. Villarreal LYB, Brandão PE, Chacón JL, Saldenberg ABS, Assayag MS, Jones RC, Ferreira AJP. (2007). Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. *Avian Diseases*, 51: 974-978.
18. Woo PCY, Lau SKP, Lam CS, Lai KK, Huang Y, Lee P, Luk GS, Dyrting KC, Chan KH, Yuen KY. (2009). Comparative analysis of complete ge-

nome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *Journal of Virology*, 83: 908-917.

19. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2: 1805-1820.
20. Woo, PCY, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, J. L. Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen, KY. (2012). Discovery of Seven Novel Mam malian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86: 3995-4008.
21. Worthington KJ, Currie RJW, Jones RC. (2008). A reverse transcriptase polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*, 37: 247-257.

**Tabella 1.** Numero identificativo e caratteristiche degli allevamenti e dei campioni effettuati

ID Allevamento	Specie	Tempistica Campionamento	Tipo di campione	Programma Vaccinale
F1	Quaglie/Broiler	CPC <sup>1</sup>	TC <sup>5</sup> /TT <sup>6</sup>	Broiler incubatoio: Mass/793B
F2	Quaglie	CPC	TC/TT	NV <sup>7</sup>
F3	Quaglie	IC <sup>2</sup> /MC <sup>3</sup>	intestino	NV
F4	Quaglie	CPC	TC/TT	NV
F5	Quaglie	CPC	intestino	Riproduttori
F6	Fagiani	CPC	intestino	1 giorno Mass
F7	Fagiani	MC	intestino	NV
F8	Fagiani	MC	intestino	NV
F9	Fagiani	MC/FC <sup>4</sup>	intestino	NV
F10	Starne	FC	intestino	NV

<sup>1</sup>CPC: Ciclo produttivo completo

<sup>2</sup>IC: inizio ciclo

<sup>3</sup>MC: metà ciclo

<sup>4</sup>FC: fine ciclo

<sup>5</sup>TC: Tamponi cloacali

<sup>6</sup>TT: Tamponi tracheali

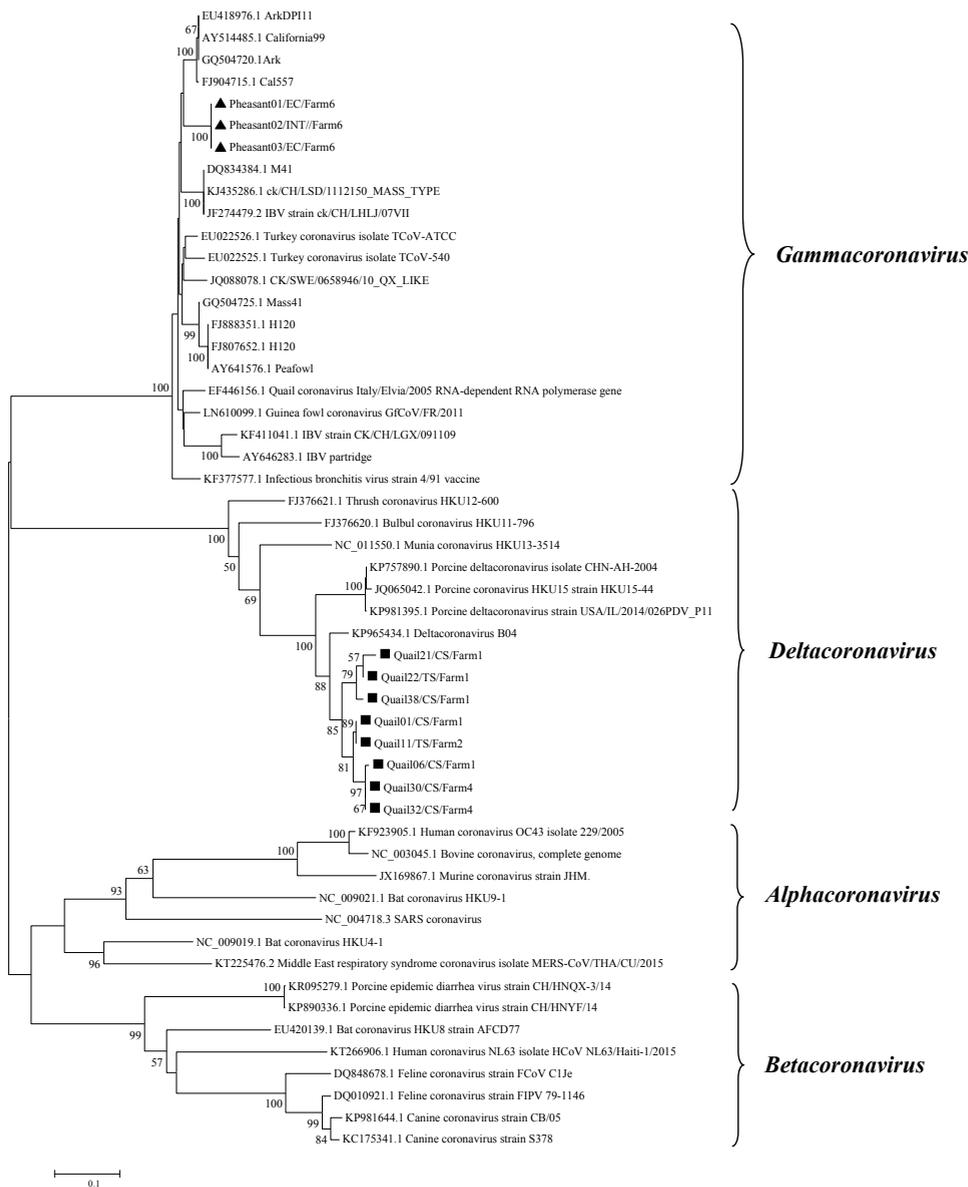
<sup>7</sup>NV: Non vaccinati

**Tabella 2.** Ceppi su cui è stata eseguita l'analisi filogenetica di una porzione dei geni RpRd ed S, specie di origine dei campioni, segni clinici osservati, tipologia di campione e numero di accesso in *GenBank* delle sequenze.

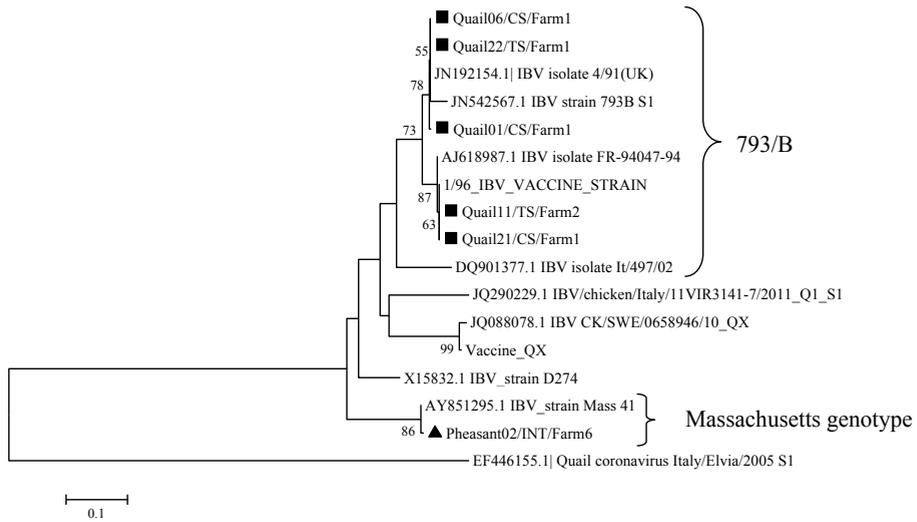
Ceppo	Specie	Segni clinici	Campione	Gene	Genbank Accession number
Quaglie01/TC/All.1	Quaglie	N/S <sup>1</sup>	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077965
Quaglie01/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	S	KX077959
Quaglie06/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077966
Quaglie06/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	S	KX077960
Quaglie21/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077967
Quaglie21/TC/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Cloacali	S	KX077961
Quaglie22/TT/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Tracheali	RPRD	KX077968
Quaglie22/TT/All.1	Quaglie	N/S	Tamponi Tracheali	S	KX077962
Quaglie38/TC/All.1	Quaglie	Ent <sup>2</sup>	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077969
Quaglie11/TT/All.2	Quaglie	Ent	Tamponi Tracheali	RPRD	KX077970
Quaglie11/TT/All.2	Quaglie	Ent	Tamponi Tracheali	S	KX077963
Quaglie30/TC/All.4	Quaglie	Ent	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077971
Quaglie32/TC/All.4	Quaglie	Ent	Tamponi Cloacali	RPRD	KX077972
Fagiani01/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	RPRD	KX077973
Fagiani02/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	RPRD	KX077974
Fagiani03/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	RPRD	KX077975
Fagiani02/INT/All.6	Fagiani	Ent	Contenuto intestinale	S	KX077964

<sup>1</sup>N/S: Nessun segno clinico

<sup>2</sup>Ent: Sintomatologia enterica



**Figura 1.** Albero filogenetico, ottenuto con il metodo *Maximum-Likelihood* (ML), basato sulle sequenze nucleotidiche di una porzione del gene RpRd (posizione nt 16179-16543) dei campioni analizzati in questo studio (campioni delle quaglie indicati con un quadrato nero e dei fagiani con un triangolo nero). Il numero riportato accanto ad ogni nodo indica il valore di *bootstrap* (sono riportati solo valori >50). Le barre rappresentano la distanza nucleotidica espressa come numero di mutazioni nucleotidiche per sito.



**Figura 2.** Albero filogenetico, ottenuto con il metodo *Maximum-Likelihood* (ML), basato sulle sequenze di una porzione del gene S (posizione nt 726-1073) dei campioni analizzati in questo studio (campioni delle quaglie indicati con un quadrato nero e dei fagiani con un triangolo nero). Il numero riportato accanto ad ogni nodo indica il valore di *bootstrap* (sono riportati solo valori >50). Le barre rappresentano la distanza nucleotidica espressa come numero di mutazioni nucleotidiche per sito.

# USO DI ACIDI ORGANICI A CORTA CATENA E RIDUZIONE DELLE LESIONI PLANTARI NEL BROILER: RISULTATI PRELIMINARI

Tosi G.<sup>1</sup>, Caminiti A.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione diagnostica di Forlì, via Don Eugenio Servadei 3E-F, 47122, Forlì*

## Summary

Short-chain fatty acids (SCFA) have several positive effects on broilers as they improve animal production parameters and show a considerable antimicrobial activity. In this study, the effect of dietary supplementation with SCFA has been evaluated on i) the growth of intestinal *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* populations, and on ii) the severity of lesions observed on the plantar surface of broilers. For the first objective, a negative binomial regression was used to evaluate the differences in the number of *C. perfringens* and *E. coli* cell forming units per gram (CFUs/g) in the ileum between broilers of the control group and broilers fed the same diet supplemented with SCFA (treatment group). For the second objective, a multinomial logistic regression was used to evaluate whether the type of diet (basal diet or diet supplemented with the additive) significantly affected the severity of lesions observed on the plantar surface.

The statistical analysis was performed in a Bayesian framework. Results showed that the number of *C. perfringens* CFUs/g significantly decreased by 77.8% (=median of the posterior distribution) in broilers receiving the feed additive, whereas the number of *E. coli* CFUs/g decreased by 97.3%. Regarding the severity of lesions observed on the plantar surface, controls were 3.55 times as likely to have mild lesions compared with broilers of the treatment group. Dietary supplementation with SCFA significantly reduced specific intestinal microbial populations and decreased the prevalence and severity of lesions on the plantar surface

## INTRODUZIONE

Da diversi anni, gli acidi grassi a corta catena (AGCC) sono utilizzati in zootecnia come additivo per mangimi. Gli AGCC hanno dimostrato di esercitare una serie di effetti positivi in allevamento quali, ad esempio, il miglioramento dei parametri produttivi, il miglioramento della palatabilità del mangime ed una notevole attività antimicrobica. Tali effetti sono stati osservati nel pollo, ma anche in altre specie animali quali il suino e il bovino (Castillo et al., 2004; Diao et al., 2016; Upadhyaya et al., 2014). Nell'ambito delle moderne tecniche di allevamento del broiler, l'attività antibatterica degli AGCC riveste un ruolo particolarmente importante, in quanto tali composti sono stati riconosciuti come una delle più promettenti alternative all'utilizzo degli antibiotici come promotori di crescita. A tal proposito, si ricorda che l'utilizzo degli antibiotici per tale scopo è stato bandito all'interno dell'Unione Europea nel 2006 (Regolamento CE No. 1831/2003).

Questo articolo descrive il disegno di studio, l'analisi statistica ed i risultati di una sperimentazione condotta direttamente in campo per verificare gli effetti di una dieta arricchita con AGCC nell'allevamento del broiler. In particolare, è stato valutato se l'impiego di AGCC è in grado di ridurre significativamente i) la crescita

di *C. perfringens* and *E. coli* nell'ileo e ii) la prevalenza e gravità delle lesioni sulla superficie plantare.

## **MATERIALI E METODI**

### **Additivo**

L'additivo utilizzato è stato Avimatrix, una preparazione granulata prodotta da Novus International (St. Charles, Missouri, USA) contenente acido benzoico (42.5–50%), formiato di calcio (2.5-3.5%) e acido fumarico (0.8-1.2%) incapsulati in una matrice lipidica.

### **Disegno dello studio**

Lo studio di campo è stato eseguito fra ottobre e novembre 2015 in un allevamento composto da quattro capannoni della capacità di 10,000 broiler ognuno. La linea genetica allevata era la Ross 308. In due capannoni selezionati dall'allevatore, i broiler sono stati alimentati con una formulazione di base, mentre negli altri due capannoni i broiler sono stati alimentati con la stessa formulazione e l'aggiunta dell'additivo al dosaggio di 500g per tonnellata di mangime completo. Questa alimentazione è stata somministrata fin dal primo giorno di vita dei broiler e continuativamente per tutto il periodo di ingrasso. L'additivo è stato fornito gratuitamente dall'azienda produttrice. L'unità sperimentale era rappresentata dai singoli broiler, i quali sono stati prelevati dai capannoni in due eventi successivi, ovvero a 20 e 34 giorni di età. Durante il primo prelievo, 10 broiler sono stati prelevati da ogni capannone da un operatore dell'allevamento istruito a selezionare gli animali lungo le pareti laterali, al centro e lungo la parte opposta all'ingresso del capannone. Con il primo prelievo sono stati perciò selezionati 40 broiler, 20 del gruppo di controllo (alimentati con dieta di base) e 20 del gruppo di trattamento (alimentati con la dieta di base arricchita con l'additivo).

I broiler prelevati sono stati sottoposti individualmente ad un esame necroscopico durante il quale è stata prelevata una porzione di ileo di circa 5 cm a valle del diverticolo di Merkel. Il contenuto fecale di questa porzione è stato analizzato per il conteggio delle unità formanti colonia per grammo (UFC/g) di *C. perfringens* and *E. coli*. Il metodo proposto da Tsiouris et al. (2013) è stato utilizzato per la conta di *C. perfringens*, mentre un metodo di analisi interno è stato utilizzato per la conta di *E. coli*. Allo stesso tempo, un veterinario patologo ha valutato in cieco la gravità delle lesioni osservate sulla superficie plantare. Questa valutazione è stata effettuata utilizzando una scala a tre livelli (0 = nessuna lesione; 1 = lesioni lievi; 2= lesioni gravi) descritta in un protocollo appositamente realizzato per la sperimentazione. Il secondo prelievo di broiler è stato effettuato a due settimane di distanza dal primo e con le stesse modalità. Anche i broiler del secondo prelievo sono stati sottoposti alle stesse analisi descritte in precedenza.

Il numero totale di broiler prelevati è stato perciò 80, di cui 40 broiler del gruppo di controllo (20 broiler di 20 giorni di età e 20 di 34 giorni di età) e 40 broiler del gruppo di trattamento (20 broiler di 20 giorni di età e 20 di 34 giorni di età).

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata condotta seguendo un approccio Bayesiano. Il software utilizzato è stato Winbugs 1.4.3 (Spiegelhalter et al., 1999).

Per valutare se il numero di UFC/g di *C. perfringens* and *E. coli* nell'ileo fosse significativamente inferiore nei broiler del gruppo trattato rispetto ai broiler del gruppo

di controllo, è stata utilizzato un modello di regressione binomiale negativa ad intercette casuali.

Per valutare se il tipo di dieta potesse influenzare il grado di severità delle lesioni osservate sulla superficie plantare, è stato invece utilizzato un modello di regressione logistica multinomiale.

La bontà di adattamento di tutti i modelli è stata valutata calcolando il p-value Bayesiano direttamente nel codice di Winbugs.

## RISULTATI

I risultati della regressione binomiale negativa sono riportati in **Tabella 1**. I risultati mostrano che il numero di UFC/g di *C. perfringens* nell'ileo era inferiore del 77,8% (valore mediano della distribuzione a posteriori) nei broiler che avevano ricevuto l'additivo rispetto ai broiler del gruppo di controllo. Per quanto riguarda *E. coli*, il numero di UFC/g era invece inferiore del 97,3% (oltre 1 riduzione logaritmica).

In **Tabella 2** è riportata la tabella di contingenza relativa alla gravità delle lesioni osservate sulla superficie plantare. I risultati della regressione logistica multinomiale sono riportati in **Tabella 3**. I risultati di questa regressione, espressi sotto forma di rapporto fra rischi relativi (RRR), mostrano che il rischio dei broiler del gruppo di controllo di sviluppare lesioni di media gravità era 3,55 volte quello dei broiler alimentati con l'additivo (**Tabella 3**). Tuttavia, non è stata osservata un differenza significativa fra il gruppo di controllo e quello di trattamento relativamente al rischio di sviluppare lesioni gravi (**Tabella 3**).

## DISCUSSIONE

Questa sperimentazione è stata condotta per investigare direttamente in allevamento gli effetti degli AGCC i) sulla crescita di specifiche popolazioni microbiche dell'ileo e ii) sulla gravità delle lesioni osservate sulla superficie plantare.

Riguardo al primo obiettivo dello studio, i risultati suggeriscono che l'uso di AGCC nel mangime riduce significativamente il numero di UFC/g di *C. perfringens* e *E. coli* nell'ileo, come osservato anche da altri autori (Stringfellow et al., 2009; Hassan et al., 2010). Riguardo al secondo obiettivo dello studio, l'uso di AGCC ha dimostrato di ridurre significativamente il numero di broiler con lesioni di lieve entità sulla superficie plantare, anche se le stesse evidenze non sono state osservate per le lesioni più gravi.

Questi risultati suggeriscono che l'aggiunta di AGCC alla dieta del broiler potrebbe produrre una combinazione di effetti biologici positivi che include la riduzione della carica batterica nella lettiera, una possibile mitigazione della virulenza di batteri patogeni ed infine una riduzione dell'infiammazione della mucosa intestinale (Khan et al., 2016; Rieke, 2002). L'infiammazione intestinale può infatti produrre delle lesioni sulla superficie della mucosa le quali possono creare una condizione di diarrea cronica e un aumento del contenuto umido della lettiera (Collett et al., 2012). L'umidità della lettiera è considerato uno dei fattori più importanti nella genesi delle lesioni necrotiche sulla superficie plantare (Taira et al., 2014).

I risultati di questo studio hanno diverse implicazioni per la salute ed il benessere del broiler. La dermatite plantare è una condizione per la quale il broiler percepisce dolore e può rappresentare una via d'ingresso per eventuali agenti patogeni.

La presenza di lesioni plantari, tra l'altro, è un parametro attualmente utilizzato in Unione europea per valutare il benessere del pollame.

In conclusione, questo studio riporta risultati preliminari promettenti per l'uso degli AGCC nell'allevamento del broiler.

## **BIBLIOGRAFIA**

Castillo, C., Benedito J. L., Méndezb J., Pereira V., López-Alonso M., Miranda M. and J. Hernández. 2004. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:101–116.

Collett, S.R., 2012. Nutrition and wet litter problems in poultry. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173, 65–75.

Diao, H., Z. Gao, B. Yu, P. Zheng, J. He, J.Yu, Z. Huang, D.Chen, and X. Mao. 2016. Effects of benzoic acid (VevoVital®) on the performance and jejunal digestive physiology in young pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7:32.

Khan, S. H., and J. Iqbal. 2016. Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *J. Appl. Anim. Res.* 44:359-369.

Hassan, H. M. A., M. A. Mohamed, Y. AW, and E. R. Hassan. 2010. Effect of using organic acids to substitute antibiotic growth promoters on performance. *Asian-Aus J Animal Sci.* 23:1348–1353

Spiegelhalter, D. J., A. Thomas, and N. G. Best. 1999. WinBUGS Version 1.2 User Manual.

Stringfellow, K., J. McReynolds, J. Lee, J. Byrd, D. Nisbet, and M. Farnell. 2009. Effect of bismuth citrate, lactose, and organic acid on necrotic enteritis in broilers. *Poult. Sci.* 88:2280-2284

Taira, K., T. Nagai, T. Obi, and k. Takase. 2014. Effect of litter moisture on the development of footpad dermatitis in broiler chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 76:583–586.

Upadhaya, S. D., Lee K. Y., and I. H. Kim. 2014. Protected organic acid blends as an alternative to antibiotics in finishing pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 11:1600-1607.

**Tabella 1.** Risultati della regressione binomiale negativa per confrontare il numero di UFC/g di *C. perfringens* and *E. coli* fra il gruppo di controllo e il gruppo di trattamento.

*C. perfringens*

	Mediana	ICP 95% <sup>a</sup>		
Coefficiente beta	-1.5	-2.4	-	-0.6
Variazione % in UFC/g nei broiler trattati <sup>b</sup>	-77.8	-91	-	-45
P-value bayesiano <sup>c</sup>	0.17			

*E. coli*

	Median	95% PCI <sup>a</sup>		
Coefficiente beta	-3.6	-6.4	-	-0.7
Variazione % in UFC/g nei broiler trattati <sup>b</sup>	-97.3	-99.8	-	-52.4
P-value bayesiano <sup>c</sup>	0.32			

<sup>a</sup> ICP 95% = Intervallo di credibilità a posteriori del 95%

<sup>b</sup> La variazione percentuale è stata calcolata secondo la formula fornita da Kennedy, P. E. (1981)

<sup>c</sup> Un valore al di sotto di 0.05 o sopra 0.95 indica una bontà di adattamento del modello non sufficiente

**Tabella 2.** Numero di broiler con lesioni gravi, lievi o nessuna lesione sulla superficie plantare nel gruppo di controllo e trattamento.

	Gravità delle lesioni		
	Gravi	Lievi	Nessuna lesione
Gruppo di controllo	1	12	27
Gruppo di trattamento	1	5	34

**Tabella 3.** Risultati e valori della bontà di adattamento del modello di regressione logistica multinomiale per valutare se il tipo di dieta potesse influenzare la gravità delle lesioni osservate sulla superficie plantare. I rapporti di rischio relativo (RRR) statisticamente significativi sono evidenziati con un asterisco\*.

<b>Gravità delle lesioni</b>	<b>Predittore</b>	<b>RRR</b>	<b>ICP 95%<sup>a</sup></b>
Lesioni lievi	Dieta di base	3.55*	1.06 - 12.21
Lesioni gravi	Dieta di base	0.65	0.03 - 6.29
P-value bayesiano <sup>b</sup>	0.54		

<sup>a</sup> ICP 95% = Intervallo di credibilità a posteriori del 95%

<sup>b</sup> Un valore al di sotto di 0.05 or sopra 0.95 indica una bontà di adattamento del modello non sufficiente

## CINETICA DI CEPPI VACCINALI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA E INTERAZIONI CON CEPPI DI CAMPO E METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN ALLEVAMENTI DI BROILER

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Drigo M.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>.

1) *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD) - Italia.*

2) *Ceva Salute Animale, Viale Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB) - Italia*

### Summary

Infectious bronchitis (IB) control is managed through biosecurity measures and vaccine administration. In Italy vaccination has been performed as an association of two genotypes, Mass and 793B-like, following the protectotype concept. Initially the vaccine administration was given in two distinct moments, 14 days apart, while recently both vaccines have been provided at first day of life. To evaluate the vaccine kinetic, 237 samples have been analysed by two different *real-time* RT-PCR specific for Mass-like and 1/96 (IBird®, CEVA). Samples have also been processed for IBV field strains detection and sequencing and aMPV screening. Vaccine kinetic showed a similar trend between the two strains, with long persistence and an analogous decline through the production cycle. 1/96 strain appeared to be slightly more protective than Mass-like ones and the detected field strains (QX, 793B, Q1) emerged mainly during the last period, such as subtype B aMPV positivities. IBV field strains and aMPV coinfections have been detected.

### INTRODUZIONE

La Bronchite Infettiva è uno dei problemi economico-sanitari più rilevanti nel comparto avicolo, mondiale (MaloA et al., 1988, De Wit et al., 2011) e italiano (Beato et al., 2005). Dal primo isolamento negli anni '30 (Jackwood, 2012) del *virus della Bronchite Infettiva* (IBV), un *gammacoronavirus*, ne sono state identificate in tutto il mondo più di 50 varianti (Valastro et al., 2016), con un grado di identità aminoacidica che oscilla dal 75 all'80% (Cavanagh, 2007). Per il controllo di questa patologia si è da subito fatto ricorso alla vaccinazione, appurando però l'inadeguatezza di un protocollo vaccinale basato sull'utilizzo di un solo ceppo di IBV al fine di generare una sufficiente immunizzazione nei confronti delle tante varianti di campo circolanti (Cook et al., 1999). Studi di cross-protezione hanno rivelato come l'associazione di due ceppi vaccinali eterologhi, in due diverse somministrazioni (Terregino et al., 2008) (*priming* e *boosting*, generalmente a 1 e 14 giorni di vita), o in singola somministrazione ad un giorno di vita (Jones et al., 2005, Awad et al., 2016), sia più efficace nella protezione contro ceppi circolanti, eterologhi e omologhi a quelli vaccinali. Questa tipologia di protocollo vaccinale è ampiamente adottata e sfrutta il concetto di "protettotipo" (Raj and Jones, 1996, Cook et al., 1999), quindi la cross-protezione indotta dall'insieme di ceppi antigenicamente dominanti (De Wit, 2000, Terregino et al., 2008). Ragionevolmente, la scelta del protocollo vaccinale e dei ceppi da utilizzare dovrebbe essere basata su evidenze epidemiologiche legate al territorio (Bande et al., 2015). In Italia, i genotipi più frequentemente riscontrati sono il QX, in aumen-

to negli ultimi anni (Franzo et al., 2014), i ceppi Mass-like e 793B, la cui persistenza è imputabile alla vaccinazione (Franzo et al., 2014) e il Q1, identificato per la prima volta in Italia nel 2011 (Toffan et al., 2011). In minor misura sono stati identificati anche i genotipi D274 e IT-02, presente dal 1999 (Dolz et al., 2006) al 2010 (Taddei et al., 2011) ma non più identificato (Franzo et al., 2014).

Ad esacerbare le problematiche respiratorie nel broiler contribuisce anche la crescente diffusione del *Metapneumovirus aviare* (aMPV), riscontrato soprattutto in animali sintomatici a fine ciclo produttivo (Cecchinato et al., 2013a). La comparsa tardiva di questo patogeno ha suggerito un possibile ruolo di *competitors* dei ceppi vaccinali e/o di campo di IBV nell'ostacolarne la replicazione (Cavanagh et al., 1999), per quanto situazioni di coinfezione non siano infrequenti.

Questo studio nasce quindi dall'esigenza di verificare e monitorare la presenza dei vaccini somministrati ad inizio ciclo produttivo, per valutare la corretta applicazione e l'efficacia del vaccino medesimo, in termini di replicazione, persistenza e "convivenza" con altri ceppi, vaccinali o di campo. La disponibilità di una visione dell'andamento nel tempo dei titoli virali dei vaccini somministrati ha stimolato curiosità riguardo all'interazione dei due vaccini, alla correlazione dei titoli virali, al legame tra i titoli e l'età degli animali e al ruolo del titolo vaccinale nel prevenire o predisporre l'ingresso di ceppi di campo o di altri patogeni di sempre più frequente riscontro, come aMPV.

## MATERIALI E METODI

### *Campioni*

I campioni analizzati provengono da allevamenti di broiler distribuiti nel Nord Italia. Il protocollo vaccinale delle aziende in esame ha previsto generalmente una doppia vaccinazione (protettotipo) con ceppi Mass-like e 793B-like (1/96, IBird®, CEVA,) ad un giorno di vita. La programmazione del campionamento ha previsto il monitoraggio degli allevamenti in almeno due punti del processo produttivo, ad inizio e a fine ciclo. I campioni sono stati raccolti in pool di 10 tamponi tracheali per allevamento/capannone, lasciati asciugare e poi conservati a -80°C fino a processazione. Per l'estrazione dell'RNA virale i tamponi sono stati stemperati in 2 ml di PBS prima di essere processati con il kit commerciale High Pure RNA Isolation Kit® (Roche).

### *Real-time RT-PCR*

Per la valutazione della cinetica vaccinale dei due ceppi di IBV sono state validate due *real-time* RT-PCR specifiche e distinte, in grado di identificare e quantificare solamente i ceppi vaccinali di interesse, Mass-like e 1/96 (IBird®) rispettivamente. Il disegno dei *primers* e delle sonde si è basato sull'allineamento delle sequenze dei vaccini a sequenze di riferimento, in corrispondenza di regioni variabili e peculiari dei ceppi di interesse. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad entrambe le *real-time* RT-PCR eseguita con il kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen™) per la quantificazione di entrambi i vaccini.

### *Approfondimenti diagnostici*

Almeno un campione per ciclo proveniente da animali oltre i 30 giorni di vita, è stato sequenziato per la ricerca del vaccino e per valutarne la stabilità genetica e inoltre, in presenza di sintomatologia respiratoria e/o aumento della mortalità, i campioni sono

stati processati per la ricerca di varianti di campo di IBV mediante una RT-PCR generica (Cavanagh et al., 1999) utilizzando il kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) e successivo sequenziamento della porzione del gene S1 amplificato, ai fini della classificazione del ceppo identificato. In aggiunta, su parte degli stessi campioni è stata parallelamente effettuata la ricerca di aMPV di tipo A o B con una *multiplex real-time* RT-PCR (Cecchinato et al., 2013b).

#### *Database*

I risultati sono stati organizzati in un database comprendente l'allevamento di provenienza, la data e l'età degli animali al momento del campionamento, le positività e i titoli virali dei due ceppi vaccinali, il genotipo del ceppo eventualmente individuato con RT-PCR e sequenziamento ed infine la positività ad aMPV sottotipo A o B.

#### *Analisi statistiche*

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software *R* e le rispettive librerie, specifiche per ciascuna analisi (Team, 2015). La presenza di una differenza significativa nei titoli dei due vaccini considerati è stata valutata, includendo l'età degli animali come covariata, eseguendo un'analisi della covarianza (ANCOVA), in particolare è stata utilizzata la "robust-ANCOVA" (Wilcox, 2012). L'effetto dei titoli vaccinali Mass-like e 793B nel condizionare la probabilità di infezione con ceppi di campo è stata valutata tramite una regressione logistica. Similmente si è proceduto a valutare un potenziale effetto protettivo dei vaccini IBV nei confronti di aMPV. Infine l'associazione fra l'infezione da aMPV e da ceppi di campo di IBV è stata valutata con un test del *Chi-quadro*. Per tutte le analisi il livello di significatività statistica è stato fissato a 0,05 ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

## **RISULTATI**

### *Real-time RT-PCR*

La validazione delle metodiche è stata condotta su vaccini titolati (con titolo pari a  $5,4 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$  per il vaccino Mass,  $5,5 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$  per il vaccino IBird®) permettendo di ottenere un *limit of detection* (LOD) di  $0,2 \text{EID}_{50}/\text{ml}$  di RNA virale, verificato mediante l'analisi di diluizioni seriali in base 10 del vaccino target della *real-time* RT-PCR specifica.

### *Campioni*

Sono stati titolati e analizzati 237 campioni mediante le due *real-time* RT-PCR specifiche per i vaccini Mass-like e IBird®. Il 91,56% dei campioni è risultato positivo per il vaccino IBird®, mentre l'81,99% per Mass. Gli approfondimenti diagnostici per la ricerca di ceppi di campo sono stati effettuati su 99 (41,77%) campioni, di cui 56 (56,56%) hanno restituito sequenze ascrivibili ad uno dei vaccini somministrati, 22 (22,22%) appartengono al genotipo QX, 15 (15,15%) sono ceppi 793B distinti dal vaccino IBird®, 5 (5,05%) sono Q1 e 1 (1,01%) è stato identificato come ceppo ricombinante. Ottantotto (37,13%) campioni sono stati testati per aMPV, le cui positività (33, 37,13%) sono tutte ascrivibili ad aMPV sottotipo B.

### Analisi

Le negatività dei titoli vaccinali si localizzano prevalentemente nei primissimi giorni (fino al 3° giorno) e a partire dal 36° giorno del ciclo produttivo, rispecchiando un trend decrescente analogo per entrambi i vaccini che appare in funzione dell'età (Fig. 1). Emerge una differenza significativa nei titoli virali tra i due vaccini, con il vaccino Mass che mostra inizialmente titoli più alti ma un successivo calo più rapido e marcato con il progredire dell'età degli animali. Ciò evidenzia un'interazione statisticamente significativa tra il singolo genotipo vaccinale e l'età, nel condizionare i titoli virali.

Lo studio dei titoli vaccinali in relazione agli esiti del sequenziamento ha messo in luce la netta diminuzione dei titoli rilevati nei campioni risultati positivi al ceppo di campo, rispetto ai campioni in cui questo non è stato riscontrato (Fig. 2a). La differenza risulta più significativa nel caso del vaccino IBird, dove titoli inferiori sono più frequentemente associati alla presenza di ceppi di campo. I titoli di IBird si mantengono inoltre entro un *range* più ridotto a differenza del Mass, non raggiungendo però valori bassi quanto quest'ultimo (Fig. 2a). Il riscontro di ceppi di campo tra i campioni testati inizia a partire dal 35° giorno di età degli animali; è infatti possibile osservare come la densità delle sequenze vaccinali sia uniformemente distribuita nell'intero arco temporale del ciclo produttivo mentre quella dei ceppi di campo sia concentra nella seconda fase (Fig. 2b). Ciò si osserva in corrispondenza dell'inizio del calo dei titoli del vaccino IBird®, mentre per il Mass si individuano anche sporadiche positività con titoli vaccinali elevati (Fig. 2b).

Anche aMPV è stato identificato a partire dal 35° giorno di ciclo produttivo (Fig. 3a) e in 12 campioni è risultato associato a ceppi di campo di IBV, 6 dei quali QX. **È stata valutata la** relazione tra i titoli dei due vaccini e la presenza di aMPV sottotipo B, che ha evidenziato almeno graficamente come i titoli dei campioni aMPV-positivi siano lievemente inferiori e di nuovo più marcatamente nel caso dell'IBird (Fig. 3b), mentre non si riscontra un'associazione statisticamente significativa tra le positività ad aMPV e IBV di campo.

### DISCUSSIONE

Il protocollo vaccinale adottato dalle aziende oggetto di questo studio ha previsto la somministrazione al primo giorno di vita dei ceppi vaccinali Mass-like e 793B-like. Alcune osservazioni in letteratura suggeriscono come la somministrazione separata dei due vaccini, a distanza di 14 giorni, sia più utile dal punto di vista del recupero funzionale dell'epitelio tracheale, che garantirebbe una più idonea risposta alla stimolazione antigenica. Tuttavia gli svantaggi gestionali della seconda vaccinazione in campo, come la disomogeneità della somministrazione o la vaccinazione di animali non più in condizioni sanitarie ottimali, potrebbero inficiarne i risultati (De Wit and Cook, 2014). Con l'utilizzo in campo di questa nuova strategia vaccinale si è voluto valutare il comportamento dei due vaccini somministrati ad un giorno di vita. I titoli virali vaccinali osservati in questo studio propongono l'esistenza di un'effettiva differenza nella cinetica dei due vaccini somministrati, con la capacità di raggiungere titoli diversi al momento del monitoraggio ma mostrando comunque una costante compresenza e un andamento simile nel tempo, senza quindi suggerire un effetto competitivo tra i due ceppi. È interessante notare come il ceppo 1/96 (IBird®), che raggiunge titoli leggermente inferiori ma che risulta più persistente,

sembri avere però un'azione maggiormente protettiva contro l'ingresso di ceppi di campo, rispetto ai ceppi Mass-like imputabile ad un effetto competitivo dovuto alla prolungata presenza vaccinale e alla protezione più efficace nei confronti del genotipo QX proposta in altri studi (Awad et al., 2016).

Il ritrovamento di sequenze sempre identiche del ceppo vaccinale IBird® lungo tutta la durata del ciclo produttivo ne ha permesso la comparazione, confermando la stabilità genetica del vaccino. Le sequenze di campo identificate mostrano una predominante circolazione del genotipo QX, prevalentemente in associazione a sintomatologia respiratoria, sebbene non si possa escludere una distorsione delle stime dovuta alla tipologia di campionamento adottata.

Gli animali sono stati campionati maggiormente nel primo periodo del ciclo produttivo, per la verifica dell'avvenuta vaccinazione e dell'inizio della replicazione virale, e successivamente nell'ultima fase, per il controllo della persistenza vaccinale e per la ricerca di patogeni in relazione alla sintomatologia riscontrata. Questo orientamento può aver introdotto un bias che si riflette in una sottostima delle positività a ceppi di campo o ad aMPV, o alla mancata identificazione del reale momento d'ingresso dei virus, per la scarsità dei campioni raccolti a metà del ciclo produttivo. La cinetica vaccinale non risente di questo fenomeno perché i grafici e le analisi statistiche permettono di stimare che l'andamento decrescente dei titoli vaccinali continui con lo stesso *trend* anche nel periodo di calo dell'intensità del campionamento.

In relazione alla ricerca di aMPV, la presenza di questo patogeno si attesta in svariati allevamenti, come la presenza di coinfezioni con ceppi di IBV nell'ultimo periodo del ciclo produttivo, indebolendo l'ipotesi dell'azione competitiva fra questi patogeni (Cecchinato et al., 2013a, Cavanagh et al., 1999). Tale evidenza sembra però essere confermata dalla minor presenza di aMPV in corrispondenza del primo periodo del ciclo produttivo, in cui i titoli vaccinali di IBV sono maggiori. Se questo riscontro sia effettivamente riconducibile all'interazione tra virus vaccinali e di campo potrà essere confermato solamente da ulteriori studi.

## CONCLUSIONI

Il protocollo vaccinale che prevede l'associazione di ceppi Mass-like e 1/96 (IBird®, CEVA) e la somministrazione al primo giorno di vita, mostra il raggiungimento e il mantenimento di titoli virali elevati per entrambi i vaccini con una buona persistenza durante il ciclo produttivo, fattore da considerare nella competizione tra ceppi vaccinali e di campo. I due vaccini sono in grado di replicare contemporaneamente senza prevalere uno sull'altro. Questo studio ha permesso inoltre di identificare episodi di coinfezione tra IBV e aMPV sottotipo B.

## BIBLIOGRAFIA

Awad, F., Hutton, S., Forrester, A., Baylis, M., Ganapathy, K., 2016. Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathol.* 45, 169-177.

Bande, F., Arshad, S.S., Hair Bejo, M., Moeini, H., Omar, A.R., 2015. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *Journal of immunology research* 2015.

Beato, M., Terregino, C., Nardi, R.D., Toffan, A., Cattoli, G., Capua, I., 2005. Epidemiological study on circulation of infectious bronchitis virus strains in North Eastern Italy [Lombardy; Veneto]. *Italian Journal of Animal Science (Italy)* .

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

Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38, 281-297.

Cecchinato, M., Drigo, M., Lupini, C., Martini, M., Listorti, V., Franzo, G., Bonci, M., Laconi, A., Morandini, E., Catelli, E., 2013a. Field survey of avian metapneumovirus in Northern Italy. *Large Animal Review* 19, 267-270.

Cecchinato, M., Lupini, C., Munoz Pogoreltseva, O.S., Listorti, V., Mondin, A., Drigo, M., Catelli, E., 2013b. Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathol.* 42, 283-289.

Cook, J.K., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B., 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477-485.

De Wit, J., 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29, 71-93.

De Wit, J., Cook, J.K., 2014. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol.* 43, 485-497.

De Wit, J., Cook, J.K., Van der Heijden, Harold MJF, 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223-235.

Dolz, R., Pujols, J., Ordóñez, G., Porta, R., Majó, N., 2006. Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathol.* 35, 77-85.

Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E., Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine* 32, 6765-6767.

Jackwood, M.W., 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56, 634-641.

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.

Malo A., Orbell B., S., Huggins B., M., Woods B., M., Cook B., J., 1988. Cross protection studies after the use of live-attenuated IBV vaccines Nobilis® IB 4-91 and Nobilis® IB Ma5 (Massachusetts type). Intervet, VSD Newsletter 17, 1-6.

Raj, G.D., Jones, R., 1996. Prototypic differentiation of avian infectious bronchitis viruses using an in vitro challenge model. *Vet. Microbiol.* 53, 239-252.

Taddei, R., Tosi, G., Barbieri, I., Fiorentini, L., Massi, P., Boniotti, B., 2011. Caratterizzazione molecolare dei ceppi del virus della Bronchite Infettiva aviaria in Italia: aggiornamento sui dati raccolti nel corso dell'anno 2010. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 50 Convegno annuale Società Italiana Patologia Aviaria (SIPA).

Team, R.C., 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012). URL: <http://www.R-project.org>.

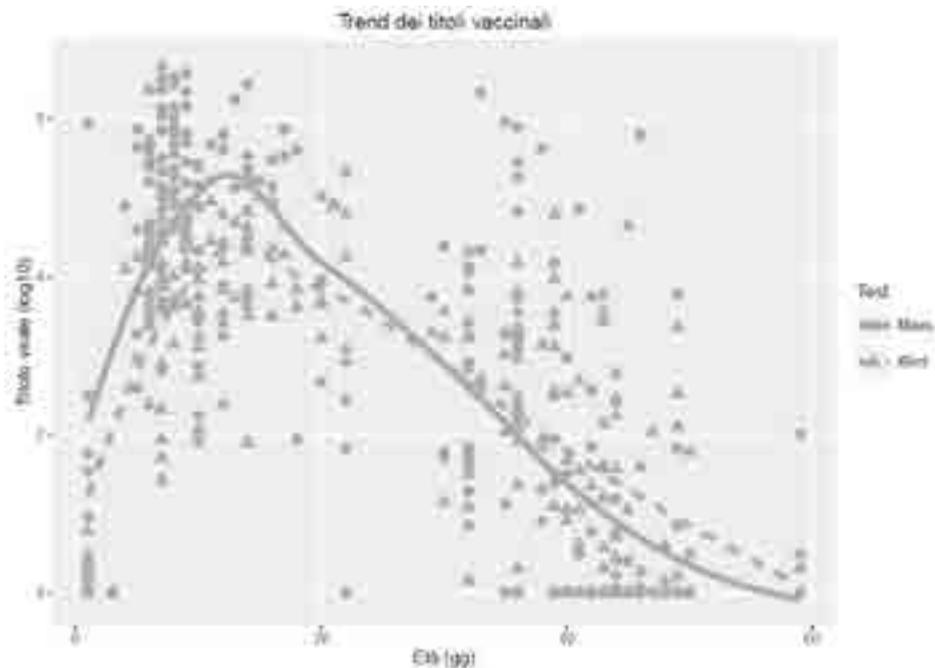
Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M., Capua, I., 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 37, 487-493.

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.

Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I., 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution* 39, 349-364.

Wilcox, R.R., 2012. Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing. Academic Press.

**Figura 1.** Andamento e confronto dei titoli vaccinali Mass-like e IBird® in funzione dell'età degli animali.



**Figura 2.:** a-b) Confronto tra titoli vaccinali e risultati del sequenziamento.

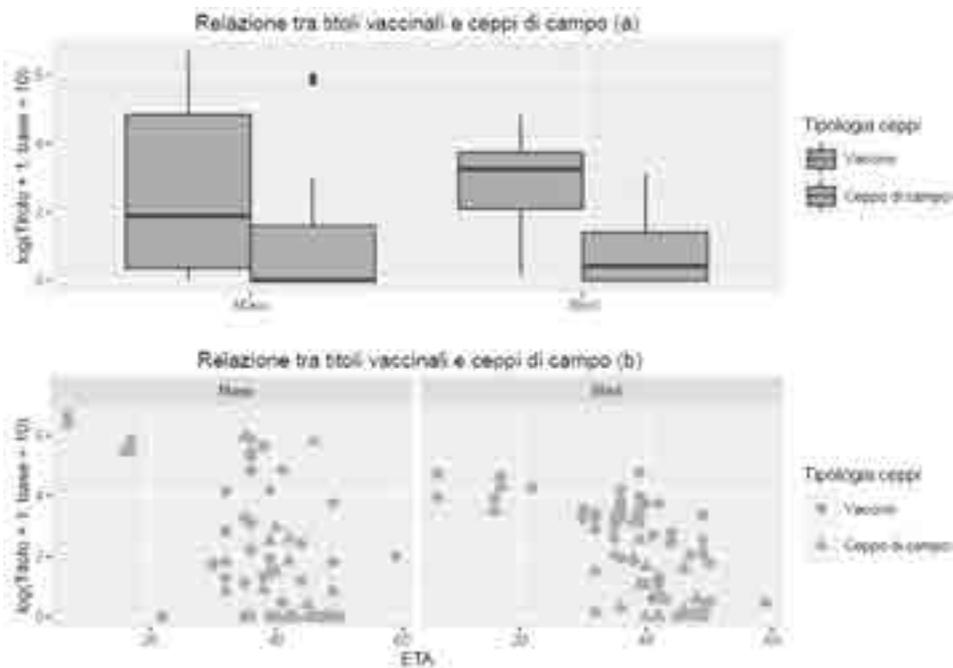
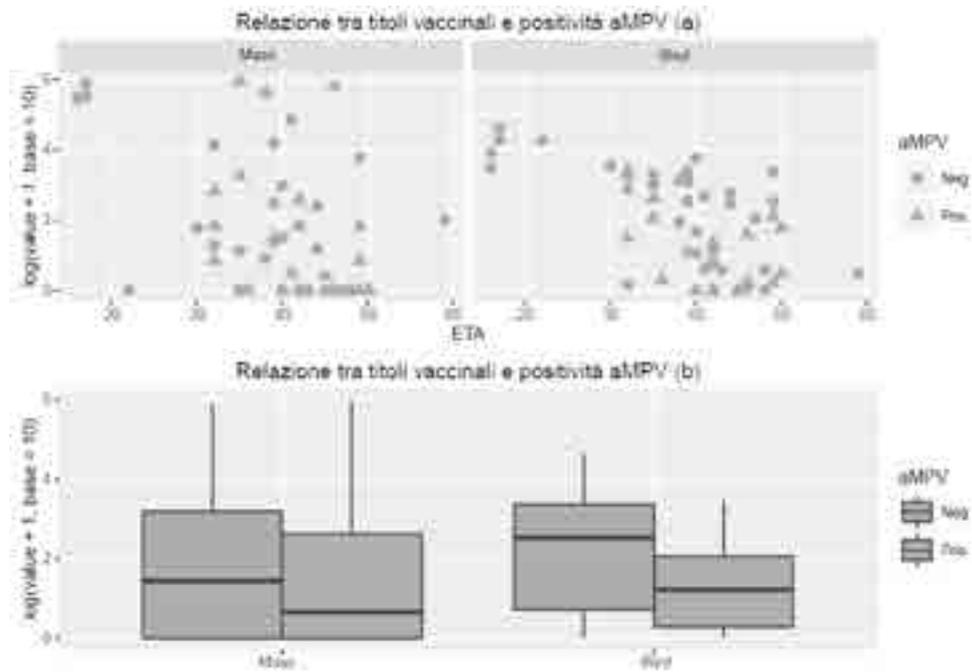


Figura 3.: a-b) Confronto tra i titoli vaccinali di campioni aMPV negativi e positivi.



# FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI DI *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* ISOLATI IN ALLEVAMENTI COMMERCIALI DI TACCHINI E POLLI DA CARNE

Zandonà L.<sup>1,2</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>, Puiatti C.<sup>1</sup>, Pozzobon G.<sup>1</sup>, Ceruti R.<sup>3</sup>, Giovanardi D.<sup>4</sup>, Bano L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba (TV)*

<sup>2</sup>*Scuola di Specializzazione in Tecnologia e Patologia delle Specie Avicole, del Coniglio e della Selvaggina, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano*

<sup>3</sup>*Gesco sca, Via Bonfandina 9, 25046 Cazzago San Martino (BS)*

<sup>4</sup>*Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi 5, 37132 San Michele Extra, Verona*

## Summary

*Riemerella anatipestifer* infection is an important reemerging issue for the Italian poultry industry. The minimum inhibitory concentration (MIC) of nine antimicrobials (amoxicillin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, penicillin G, streptomycin, tetracycline, tilmicosin, trimethoprim/sulfamethoxazole) was determined against 102 field strains of *Riemerella anatipestifer* isolated in Italy in 74 meat turkeys and 28 meat chickens commercial farms, from 2012 to 2015. MICs were determined by broth microdilution method, according to the CLSI document M07-A10 (2015). The lowest MIC90 were observed for beta-lactams (ceftiofur, penicillin G and amoxicillin) and the highest for tilmicosin. The MIC90 of ceftiofur, penicillin G and tetracycline resulted lower than the values recorded in China and Taiwan for duck isolates.

## INTRODUZIONE

*Riemerella anatipestifer* (RA) è considerato un importante patogeno per gli allevamenti avicoli mondiali. Storicamente l'infezione è associata a polisierositi e setticemie che colpiscono prevalentemente gli anatidi di 1-8 settimane di vita (5). In Italia i primi focolai di riemerellosi sono stati descritti in tacchini e polli da carne alla fine degli anni 70. In questi episodi la sintomatologia era prevalentemente nervosa e, nel tacchino, era sporadicamente accompagnata ad oftalmi bilaterali (4,6). Dopo quelle prime segnalazioni la malattia ha continuato ad essere presente negli allevamenti italiani di tacchini da carne con andamento altalenante, mentre nel pollo veniva segnalata nuovamente solo a partire dal 2012, in associazione ad importanti quadri meningoencefalici (1). Il contenimento della malattia è affidato a trattamenti profilattici o terapeutici. Quelli profilattici sono basati sull'impiego di vaccini batterici inattivati la cui efficacia dipende dalla variabilità antigenica dei ceppi circolanti (sierotipi), mentre il trattamento con antimicrobici viene attuato in presenza di sintomatologia clinica. In letteratura sono disponibili poche informazioni riguardo alla sensibilità agli antimicrobici di RA, e riguardano per lo più ceppi isolati da anatidi in paesi extraeuropei (2, 8). Con il presente studio si è voluto indagare l'efficacia *in vitro* di alcuni antimicrobici nei confronti di ceppi clinici di *Riemerella anatipestifer* isolati da broiler e tacchini da carne in Italia.

## MATERIALI E METODI

### *Ceppi batterici*

Lo studio è stato eseguito utilizzando 102 ceppi di RAisolati in Italia tra il 2012 e il 2015 in 28 allevamenti industriali di broiler ed in 70 allevamenti di tacchini da carne. L'isolamento è stato eseguito seminando il campione in terreno non selettivo (agar sangue), incubato in condizioni di microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>), a 37°C per 24-48 ore. L'identificazione è stata eseguita mediante prove biochimiche e MALDI-TOFMS (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). I ceppi batterici sono stati conservati a -80 °C in Cryo-banks (Nalgene) sino all'esecuzione delle prove di farmacosenibilità.

### *Determinazione della minima concentrazione inibente*

Per la valutazione della sensibilità batterica agli antimicrobici si è fatto ricorso alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) col metodo della microdiluizione in brodo, secondo le procedure descritte nel documento CLSI M07-A10 (3).

Il terreno colturale era il Cation Adjusted Muller Hinton Broth (CAMHB) addizionato col 5% v/v di eritrociti lisati di cavallo. Gli inoculi batterici sono stati allestiti partendo da sospensioni con torbidità pari a 0,5 McFarland. Dopo l'inoculazione le piastre a 96 pozzetti sono state incubate a 35°C per 24- 48h in condizioni di microaerofilia (5-10% CO<sub>2</sub>). Il valore di MIC assegnato corrispondeva alla più bassa concentrazione di antimicrobico in grado di inibire la crescita visibile del microrganismo.

Sono stati saggiati i seguenti principi attivi all'interno di diversi range di concentrazione: amoxicillina (0,031– 64 mg/L), ceftiofur (0,015–32 mg/L), enrofloxacin (0,015– 6 mg/L), florfenicolo (0,031–64 mg/L), penicillina G (0,031–4 mg/L), streptomina (0,5– 256 mg/L), tetraciclina (0,125–16 mg/L), tilmicosina (0,062 – 64 mg/L) e trimethoprim/sulfamethoxazolo (0,062/1,187– 32/608 mg/L). Per ciascun farmaco è stata calcolata la MIC in grado di inibire la crescita del 50% (MIC<sub>50</sub>) e del 90% (MIC<sub>90</sub>) dei ceppi esaminati.

## RISULTATI

I risultati da noi ottenuti non hanno evidenziato differenze di efficacia dei diversi principi attivi considerati nei confronti dei ceppi batterici isolati dal pollo o dal tacchino. In tabella 1 sono riportate la distribuzione delle MIC dei nove antimicrobici, unitamente ai valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>.

Il ceftiofur ha mostrato la maggiore efficacia *in vitro*, inibendo il 92% dei ceppi di tacchino e l'86% dei ceppi di pollo con una concentrazione di 0,016 mg/L.

Al contrario, la maggior parte dei ceppi testati è risultata inibita da elevate concentrazioni di streptomina e tilmicosina. In particolare, la MIC di quest'ultima molecola è risultata >64 mg/L per l'89% dei ceppi di pollo ed il 99% dei ceppi di tacchino. La distribuzione delle MIC di penicillina e amoxicillinanei confronti dei ceppi isolati dal polloevidenzia la presenza di una esigua sub-popolazione completamente sensibile alle più basse concentrazioni di farmaco. I ceppi che dimostrano la maggiore sensibilità alle più basse concentrazioni di amoxicillina sono gli stessi che presentano la maggiore sensibilità alla penicillina. La distribuzione delle MIC della streptomina presenta un chiaro andamento bimodale e suggerisce

l'esistenza di due sub-popolazioni: una completamente sensibile alla streptomicina, con MIC  $\leq 2$  mg/L, ed una presumibilmente resistente o intermedia, con MIC  $>8$  mg/L (10).

## DISCUSSIONE

Per l'interpretazione della sensibilità di RA agli antimicrobici non sono disponibili breakpoint clinici e ci si deve basare unicamente sulla distribuzione delle MIC.

RA presenta un tropismo per vari organi/tessuti dell'ospite: articolazioni, sierose, occhio, polmone, trachea, ovidutto, SNC. La scelta del farmaco dovrebbe basarsi sulle caratteristiche farmacocinetiche del principio attivo considerato e sulla possibilità che questo raggiunga negli organi target concentrazioni valori maggiori o uguali alla MIC del ceppo isolato. Sebbene gli antibiotici beta-lattamici abbiano evidenziato capacità di inibire la crescita di RA *in vitro* anche a basse concentrazioni, la loro distribuzione nel SNC, in assenza di fenomeni infiammatori, risulta alquanto ridotta. Tali farmaci, invece, potranno risultare efficaci in caso di polisieposite, purché in assenza di localizzazione cerebrale.

Alcuni ricercatori asiatici (2, 9), valutando la sensibilità agli antimicrobici di ceppi di RA isolati da anatre, hanno ottenuto valori di MIC<sub>90</sub> di ceftiofur, penicillina, tetraciclina e sulfamidici nettamente superiori a quelli ottenuti nel nostro studio (penicillina: 16 vs 1 mg/L; tetraciclina: 128-256 vs 2 mg/L; ceftiofur: 32 vs 0,032 mg/L; sulfamidici potenziati: 8 vs 0,5 mg/L). Questo risultato potrebbe essere dovuto alla diverse pratiche terapeutiche adottate in Italia rispetto a quelle in uso in Cina e Taiwan, ed in particolare al divieto d'uso del ceftiofur nel pollame, vigente nel nostro paese.

**Tabella 1.** Distribuzione delle MIC, MIC50 e MIC90 dei principi attivi esaminati, nei confronti di 102 ceppi di *R. anatipestifer* isolati da broiler (B) e tacchino da carne (T). PEN: penicillina; AMX: amoxicillina; ENR: enrofloxacina; FFC: florfenicolo; STR: streptomicina; TET: tetraciclina; TILM: tilmicosina; CEF: ceftiofur; STX: trimethoprim-sulfamethoxazolo.

MIC (mg/L)	0,016	0,032	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	MIC50	MIC <sub>90</sub>
<b>Penicillina</b>																	
B	-	3	0	0	10	14	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
T	-	1	0	1	16	54	2	0	0	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
<b>Amoxicillina</b>																	
B	-	3	0	0	7	15	2	0	0	0	0	1	0	-	-	0,5	1
T	-	1	0	0	9	57	6	1	0	0	0	0	0	-	-	0,5	0,5
<b>Enrofloxacina</b>																	
B	-	0	1	0	2	17	7	1	0	0	0	0	-	-	-	0,5	1
T	-	0	0	0	1	56	17	0	0	0	0	0	-	-	-	0,5	1
<b>Florfenicolo</b>																	
B	-	0	0	0	3	21	2	2	0	0	0	0	0	-	-	0,5	1
T	-	0	0	0	3	39	31	1	0	0	0	0	0	-	-	0,5	1
<b>Streptomicina</b>																	
B	-	-	-	-	-	1	1	3	0	0	3	6	4	10	0	64	128
T	-	-	-	-	-	1	1	2	0	1	1	10	33	23	2	64	128
<b>Tetraciclina</b>																	
B	-	-	-	2	1	3	9	12	1	0	0	-	-	-	-	1	2
T	-	-	-	0	1	3	25	45	0	0	0	-	-	-	-	2	2
<b>Tilmicosina</b>																	
B	-	-	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	25	-	-	64	64
T	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	73	-	-	64	64
<b>Ceftiofur</b>																	
B	24	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	-	-	0,016	0,032
T	68	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0,016	0,016
<b>Sulfamethossazolo +trimeth.</b>																	
B	-	-	1	12	10	3	2	0	0	0	0	0	-	-	-	0,25	0,5
T	-	-	3	16	42	10	1	2	0	0	0	0	-	-	-	0,25	0,5

## BIBLIOGRAFIA

1. Bano L., De Zan G., Viel L., Drigo I., Fracas V., Vascellari M., Agnoletti F. (2013). Episodi di meningite da *Riemerella anatipestifer* nel pollo da carne: aspetti clinici e diagnostici. Atti del LII convegno annuale SIPA (Società Italiana Patologia Aviaria), Forlì, 11-12 Aprile 2013.
2. Chang, C.F., W.H. Lin, T.M. Yeh, T.S. Chiang, and Y.F. Chang. (2003). Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and the efficacy of ceftiofur treatment. *J Vet Diagn Invest.* 15:26–29.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; approved standard, tenth ed. CLSI document M07-A10, vol. 35, No. 2., Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
4. Giovanetti. L., Pascucci. S., (1983). Evolution of *Pasteurella anatipestifer* infection in turkey and fowl. *Clinical Veterinarian (Milan)*, 106 (1983) pp. 42-44.
5. Ruiz JA and Sandhu TS. *Riemerella anatipestifer* Infection. In *disease of Poultry*, 13th edition (2013), David E. Swayne, pag. 823-828.
6. Pascucci, S., Pacchioni. G., Tagliabue. S., Giovanetti. L., (1981). *Pasteurella anatipestifer* infection in turkey and fowl. *Clinical Veterinarian (Milan)*, 104 (1981), pp. 352–354
7. Pascucci, S., Giovannetti, L. e Massi, P. (1990). Characteristics of *Pasteurella anatipestifer* strains isolated in Italy. *Zootecnica International*, 50-53.
8. Chong Yue Zhong, An Chun Cheng, Ming Shu Wang, De Kang Zhu, Qi Hui Luo, Chuan De Zhong, Ling Li, and ZeDuan. (2009). Antibiotic Susceptibility of *Riemerella anatipestifer* Field Isolates. *Avian Diseases* 53(4):601-607.
9. Na Sun, Jian-Hua Liu, Fan Yang, Da-Chuan Lin, Guang-Hui Li, Zhang-Liu Chen, Zhen-Ling Zeng. (2012). Molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks. *Veterinary microbiology*, 3-4, 376-383.
10. EUCAST, 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 503–508.



# **INDICE DEGLI AUTORI**



Adaska J.M. 194  
 Agnoletti F. 261  
 Alberti S. 123  
  
 Banco B. 125  
 Bano L. 107, 142, 152, 261  
 Battistoni F. 95  
 Bellinati L. 205  
 Berto G. 187, 252  
 Bonci M. 157  
 Bonfante F. 132  
 Bonfanti L. 57  
 Borgonovo F. 183  
 Borrelli L. 149  
 Boscarato M. 179  
 Brandão P.E. 237  
  
 Calistri P. 51  
 Calligarich C. 125  
 Camarda A. 27, 98, 142, 198  
 Caminiti A. 222, 233, 246  
 Catania S. 73, 139, 179, 194  
 Catelli E. 157, 171, 187, 205, 218, 237  
 Cavazzoni R. 118  
 Cecchettin K. 164  
 Cecchinato M. 157, 171, 187, 205, 218,  
 227, 237, 252  
 Ceruti R. 261  
 Circella E. 27, 98, 142, 198  
 Cocchi L. 125  
 Cocciolo G. 142, 198  
  
 Da Ros D. 35  
 Davidson I. 164  
 Della Valentina M. 35  
 De Luca Bossa L.M. 149  
 De Virgilio C. 198  
 Dipineto L. 149  
 D'Onghia F. 142, 198  
 Drago A. 164  
 Drigo I. 152  
 Drigo M. 237, 252  
  
 Farioli M. 83  
 Feberwee A. 110  
 Felice V. 157, 187, 205  
 Ferrante V. 183  
 Ferrari L. 183  
 Ferrari N. 125  
 Fiorentini L. 222, 233, 246  
 Fioretti A. 149  
 Flaminio B. 179  
 Fontana I. 183  
 Formenti N. 125  
 Fortin A. 164  
 Franzo G. 157, 171, 187, 218, 227, 237, 252  
 Fregnani G. 222  
  
 Gallazzi D. 125  
 Gargiulo A. 149  
 Giovanardi D. 157, 261  
 Gobbo F. 179, 218  
 Greco G. 142  
 Grieco V. 125  
 Grilli G. 125, 139, 183  
 Guarino M. 183

Landman Wil J.M. 110  
Leopardi S. 132  
Liebhart D. 111  
Listorti V. 157, 187, 205, 237  
Longoni C. 227  
Lupini C. 157, 187, 205, 237

Mainenti M. 218  
Mainenti M. 194  
Maniero S. 132  
Marangon S. 73  
Marino M. 142, 198  
Martin A. M. 65  
Martini M. 218  
Marzano G. 142  
Massi P. 205, 222, 233, 246  
Mazzetto E. 132  
Meini A. 187  
Mescolini G. 157, 187, 205  
Monne I. 164  
Moronato M.L. 179, 218

Nardini G. 139

Ochoa J.N. 194

Pace A. 149  
Parigi M. 222, 233  
Pascoletti S. 152  
Pedicone R. 117  
Pesente P. 157, 205  
Piccirillo A. 164

Pozzobon G. 261  
Pugliese N. 198  
Puiatti C. 152, 261

Raia P. 149  
Rimoldi G. 194  
Romito D. 142, 198  
Rossi G. 205  
Russo E. 227  
Russo T.P. 149

Salomoni A. 132  
Santone C. 179  
Scaravelli D. 233  
Scolari A. 102  
Shivaprasad H.L. 194  
Silveira F. 157, 187

Terregino C. 43, 132, 164  
Tonon E. 152  
Torres C.A. 237  
Tosi G. 107, 205, 222, 233, 246  
Tucciarone C.M. 171, 227, 252  
Tullo E. 183

Varriale L. 149  
Vicenzoni G. 194

Zandonà L. 261

# EFFERVESCENTE INNOVAZIONE

## MERIAL:

soluzioni innovative,  
**PRATICHE**, **AFFIDABILI**  
ed **ECO-SOSTENIBILI**,  
per andare incontro alle sfide  
del mondo avicolo di oggi,  
guardando al futuro.



**MERIAL**  
A SANOFI COMPANY  
[www.merial.it](http://www.merial.it)

**MERIAL. LA RICERCA VERSO IL CAMBIAMENTO**

PER AFFRONTARE  
LA MINACCIA DELLE  
MALATTIE SERVE  
INNOVAZIONE.

E LA NOSTRA  
SCIENZA.



**MSD**

Animal Health

La principale sfida che il virus della bronchite infettiva aviaria (IBV) pone ai ricercatori è la rapidità e frequenza con cui la malattia evolve e si diffonde. Questa minaccia costante richiede approcci innovativi per massimizzare l'efficacia delle risorse disponibili. Il nuovo concetto di MSD Animal Health, "PROTECTOTYPE", valuta l'affinità tra anticorpi prodotti da differenti ceppi vaccinali e le nuove varianti di campo del virus della IB, consentendo ai veterinari di progettare programmi di immunizzazione in grado di garantire la costante protezione degli animali.

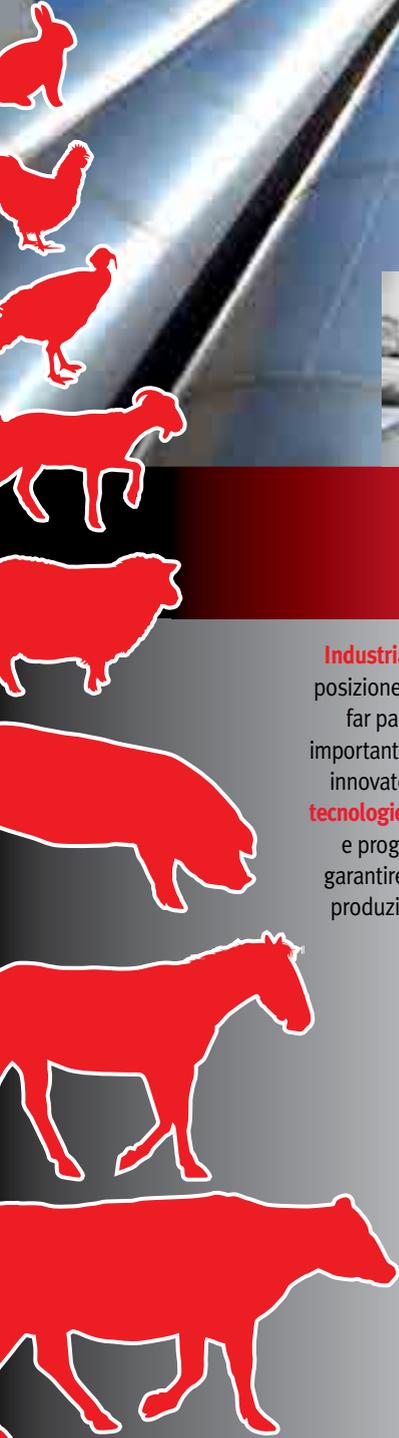
La possibilità di associare ceppi vaccinali quali Ma5 e 4/91, di dimostrata efficacia nella protezione contro una vasta gamma di virus della IB in tutto il mondo, e un vaccino ceppo QX, omologo al principale ceppo attualmente circolante in Italia, rappresenta una adeguata soluzione per tutte le esigenze di campo.

Per maggiori informazioni, andate su [msd-animal-health.it](http://msd-animal-health.it)

**LA SCIENZA PER ANIMALI PIU' SANI**

Prevention  
**STARTS HERE**





**Qualità & Innovazione**



## Dal 1968, farmaco e nutrizione per i vostri animali

**Industria Italiana Integratori TREI S.p.A.**, fondata nel 1968, ha progressivamente conquistato una posizione di leadership nel settore della salute e dell'alimentazione animale e, dal 2014, è entrata a far parte del **gruppo aniMedica GmbH**. Il percorso che ha condotto l'azienda a rivestire un ruolo importante nel panorama veterinario - in Italia e all'estero - è stato naturalmente suggerito dai principi innovatori che hanno caratterizzato la società sin dalla sua costituzione. **TREI** ha sempre adottato **tecnologie all'avanguardia**, operando in linea con i rigidi parametri delle Buone Pratiche di Produzione e programmi di aggiornamento costante sia dei collaboratori che degli impianti con l'obiettivo di garantire **prodotti sicuri e di elevata qualità** al singolo Cliente. La sede amministrativa, l'officina di produzione e i magazzini sono situati a **Rio Saliceto**, in provincia di Reggio nell'Emilia e occupano una superficie di 16.000 metri quadrati, di cui oltre 10.000 coperti.



# SOLUZIONI DI OGGI PER PROBLEMI DI OGGI

A photograph of two fluffy yellow chicks on a dirt ground. One chick is in the foreground, looking towards the right, while another is slightly behind it. The background is a blurred natural setting.

VACCINI  
DIAGNOSTICI  
COCCIDIOSTATICI  
VACCINAZIONE IN-OVO

Zoetis Italia srl - Via Andrea Doria 41 M - 00192 Roma - www.zoetis.it

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

**zoetis**



Finito di stampare  
nel mese di Settembre 2016  
da La Ducale Srl - Parma

