



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2017



LVI Convegno Annuale II° Simposio Scientifico

Forlì, 6-7 Aprile 2017 - Parma, 22 Settembre 2017

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE ATTI del LVI Convegno Annuale - II° Simposio Scientifico

In copertina: **White Knight Rooster**, Arti Chauhan
www.artichauhanart.co.uk

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2017**

**Forlì, 6-7 Aprile 2017
Parma, 22 Settembre 2017**



INDICE

Prefazione pag. 15

ATTI DEL LVI CONVEGNO ANNUALE

Forlì, 6-7 Aprile 2017

INCONTRO

*“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:
focus sulle principali malattie osservate durante il 2016”*

- STATO SANITARIO BROILERS NEL 2017
Ferdinando Battistoni pag. 19
- STATO SANITARIO DELLE GALLINE OVAIOLE 2016 - 2017
Antonio Camarda pag. 21
- PATOLOGIE DEL TACCHINO ANNI 2016-2017
Enrico Alessandri pag. 25
- LE PRINCIPALI PROBLEMATICHE SANITARIE DELLE SPECIE
“MINORI” NEGLI ANNI 2016-17
Alessandro Scolari pag. 27

CONVEGNO

*“Malattie respiratorie virali nel settore avicolo:
aggiornamenti diagnostici ed epidemiologici e strategie di controllo”*

- LARINGOTRACHEITE INFETTIVA AVIARE: DIAGNOSI, CARATTERIZ-
ZAZIONE DEI CEPPI E STRATEGIE DI CONTROLLO
Ana Moreno Martin pag. 33
- 40 ANNI DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE: COSA ABBIAMO IMPARATO
E QUALI SFIDE PER IL FUTURO
Elena Catelli pag. 41
- AGGIORNAMENTI SULLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE
Paola Massi pag. 43
- LA TECNOLOGIA DI CONTROLLO DELLA QUALITÀ DELL’ARIA
NELL’ALLEVAMENTO AVICOLO: PASSATO, PRESENTE E FUTURO
Ilaria Fontana pag. 55

ATTI DEL II SIMPOSIO SCIENTIFICO SIPA
Parma, 22 Settembre 2017

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- Casagrande Proietti P., Bellucci S., De Luca S., Guelfi G., Pieramati C., Franciosini M.P. VALUTAZIONE FENOTIPICA E GENOTIPICA DELLA SUSCETTIBILITÀ AI BETA LATTAMICI IN CEPPI DI *C. COLI* E *C. JEJUNI* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE pag. 61
- Catania S., Mainenti M., Zanardello C., Picchi M., Matucci A., Gobbo F. *MYCOPLASMA SYNOVIAE*: UN OTTIMO ESEMPIO DI PATOGENO ADATTABILE ALLE CONDIZIONI DELL'OSPITE. CASO CLINICO... pag. 69
- Dipineto L., Borrelli L., D'Orazio S., Romano V., Varriale L., Russo T.P., Pace A., Fioretti A., Menna L.F. PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER COLI* IN VOLATILI PET pag. 75
- Fortin A., Cecchetti K., Drago A., Leardini S., Marciano S., Terregino C. CRITICITÀ DELLA DIAGNOSI MOLECOLARE PER LA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE pag. 79
- Fregnani G., Massi P., Fiorentini L., Tosi G., Romboli C., Bocciero R., Scaravelli D., Parigi M. PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA EMOPARASSITI IN SPECIE DI AVIFAUNA SELVATICA IN EMILIA ROMAGNA pag. 87
- Gobbo F., Tonellato F., Moronato M.L., Rizzi S., Catania S. LA M.I.C. UTILE STRUMENTO DI MONITORAGGIO DELL'ANTIBIOTICO SENSIBILITÀ. L'ESPERIENZA CON IL *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* pag. 93
- Grilli G., Pagnoni A., Calligarich C., Guarneri P., Mondella M., Stonfer M. CONFRONTO TRA DUE SISTEMI DI CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI NELLA POLLASTRA LEGGERA: OSSERVAZIONI DI CAMPO pag. 101
- Grilli G., Calligarich C., Ferrazzi V., Trapani A., Tirloni E., Stella S. OSSERVAZIONI SULLA PRESENZA DI *CAMPYLOBACTER* TERMOFILII NELLE STRUTTURE DI ALLEVAMENTO E NEI BROILERS pag. 107
- Grilli G., Pasini G., Calligarich C., Guffanti P., Ferrante V., Facchetti G., Fasoli P., Pradella G., Colnago G. UTILIZZO DI ALCUNI ESTRATTI VEGETALI NEL BROILER: INFLUENZA SULLO STATO SANITARIO E SULLE PERFORMANCES PRODUTTIVE pag. 113

- Listorti V., Laconi A., Catelli E., Cecchinato M., Lupini C., Naylor C.J. IDENTIFICAZIONE DI MARKER MOLECOLARI PER LA DIFFERENZIAZIONE DI UN VACCINO IBV GENOTIPO QX pag. 121
- Mainenti M., Dall'Angelo A., Zanardello C., Moronato M.L., Catania S., Terregino C. ADENOVIRUS DI TIPO II IN FARAONE CON SPLENITE ED ENTERITE EMORRAGICA. CASO CLINICO pag. 131
- Mazzetto E., Bonfante F., Salomoni A., Boscolo L., Maniero S., Meini A., Berto G., Terregino C. COMPARAZIONE DELL'EFFICACIA PROTETTIVA DI UN PROTOCOLLO VACCINALE TRADIZIONALE PER NDV RISPETTO AD UNA SINGOLA SOMMINISTRAZIONE DI UN VACCINO RICOMBINANTE HVT-NDV IN TACCHINI DA CARNE A FINE CICLO pag. 135
- Parigi M., Massi P., Fiorentini L., Tosi G., Romboli C., Vandi L., Bocciero R., Fregnani G. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UNA MISCELA DI ACIDI ORGANICI E FITOTERAPICI NEL CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA *ESCHERICHIA COLI* NEL TACCHINO pag. 141
- Profeta F., Di Giannatale E., Scacchia M., Orsini M., Toscani T., Marsilio F., Di Francesco C.E. CIRCOLAZIONE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS NETB* POSITIVI IN ALLEVAMENTI AVICOLI DEL CENTRO ITALIA pag. 147
- Rampa L., Borrelli L., Gargiulo A., De Luca Bossa L.M., Paone S., Raia P., Fioretti A., Dipineto L. ATTIVITÀ VETERINARIE DEL CENTRO RECUPERO ANIMALI SELVATICI DI NAPOLI NEL 2016 pag. 153
- Russo E., Felice V., Recordati C., Tasoniero G., Dalle Zotte A., Catelli E., Lupini C., Longoni C., Cecchinato M. EVOLUZIONE DELLE LESIONI MACROSCOPICHE E MICROSCOPICHE DA WHITE STRIPING NEL BROILER pag. 157
- Tucciarone C. M., Franzo G., Lupini C., Torres Alejo C., Listorti V., Mescolini G., Brandão P. E., Martini M., Catelli E., Cecchinato M. EPIDEMIOLOGIA DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* NEL POLLO DA CARNE IN ITALIA pag. 163

INDICE DEGLI AUTORI pag. 173

Linea Bronchite Infettiva Ceva. L'abbinamento perfetto.

OVUNQUE CI PORTI IL FUTURO
GARANTIAMO LA LORO SALUTE



TERAPIE
FARMACEUTICHE

SUPPORTI
FUNZIONALI

SOLUZIONI
ANTIBIOTIC-FREE



Via Don Eugenio Servadei, 16 - 47122 Forlì (FC) - ITALY - tel. +39 0543 796464 - e-mail: info@chemifarma.it - www.chemifarma.it



Ceva Salute Animale S.p.A.
Viale Colleoni 15 - 20864 Agrate Brianza (MB)
Tel. 039 6559 442 - e-mail: marketing.italy@ceva.com
www.ceva-italia.it



UNIFORMITÀ ASSICURATA

Un valore per la vostra impresa

La migliore uniformità importa

- Costanza nelle classi di peso dei prodotti
- Efficienza nella macellazione
- Broiler misti e sessati con la migliore uniformità
- Valori di resa maggiori
- Riduzione nel declassamento del macellato
- Aumento dei profitti



cobb-vantress.com



UNA FAMIGLIA.
UN PROPOSITO.

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@doyal.com



Perdite produttive?



AIVLOSIN®

La risposta efficace e sostenibile ai problemi causati dai micoplasmi

- ✓ Efficace contro ceppi resistenti
- ✓ Rapido assorbimento
- ✓ Basso dosaggio terapeutico
- ✓ Breve durata del trattamento: 3 giorni

...e con "0" giorni nelle uova!!



Aivlosin 625 mg/g Granulato per uso in acqua da bere. Principio attivo: tilvalosina tartrato 625 mg/g. **Forma farmaceutica:** Granulato per uso in acqua da bere. Specie di destinazione: Polli. **Indicazioni per l'utilizzazione:** Trattamento e prevenzione di malattie respiratorie associate a *Mycoplasma gallisepticum* nei polli. Trattamento di malattia respiratoria associata a ceppi di *Ornithobacterium rhinotracheale* sensibili alla tilvalosina nei tacchini. **Controindicazioni:** nessuna. Reazioni sfavorevoli: nessuna conosciuta. Interazione con altri medicinali veterinari ed altre forme d'interazione: nessuna conosciuta. **Posologia e via di somministrazione:** per somministrazione in acqua da bere. Trattamento di malattie respiratorie associate a *Mycoplasma gallisepticum*: Posologia: 25 mg di tilvalosina per kg di peso corporeo al giorno, disciolti in acqua da bere per 3 giorni consecutivi. Tacchini: Trattamento di malattie respiratorie associate a *Ornithobacterium rhinotracheale*: La dose è 25 mg di tilvalosina per kg di peso corporeo al giorno, disciolti in acqua per 5 giorni consecutivi. **Tempo di sospensione:** Carne e visceri: 2 giorni; Uova (polli): zero giorni. **Periodo di validità dell'acqua da bere medicamentosa:** 24 ore. Speciali precauzioni per la conservazione: Non conservare a temperatura superiore ai 30 °C. **Natura e composizione del condizionamento primario:** Bustina in foglio di alluminio accoppiato da 40 g e 400 g. **TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** ECO Animal Health Limited 78 Coombe Road, New Malden, Surrey; KT3 4QS; Regno Unito. **NUMERO DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** EU/2/04/044/018 - 40 g EU/2/04/044/019 - 400 g.

Per maggiori informazioni contattare: Tel. +39 02 82950604 / www.ecuphar.it / info@ecuphar.it

LA SOLUZIONE ELANCO A 360°

AviPro.
SALMONELLA VAC E

AviPro.
SALMONELLA VACT

AviPro.
SALMONELLA DUO

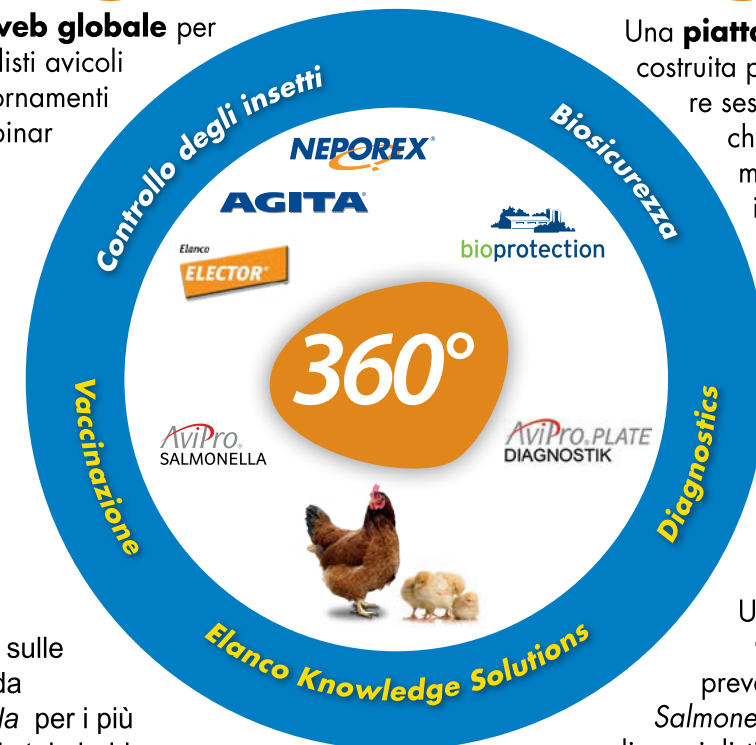


Salmonella 360°.com

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



Vaccino vivo liofilizzato
contro la malattia di Newcastle
e la Bronchite Infettiva

BIO-VAC NDV 6/10-H120

BIVALENTE CON **CEPPO ESCLUSIVO FATRO NDV 6/10**

SOMMINISTRAZIONE **SPRAY IN INCUBATOIO**

ASSENZA DI REAZIONE POST-VACCINALE



Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2017 sono realizzate grazie al contributo di:

- BAYER Sanità animale
- BOEHRINGER INGELHEIM - MERIAL
- CEVA Salute animale
- CHEMIFARMA
- COBB
- DOX AL ITALIA
- ECUPHAR
- ELANCO Animal Health
- FATRO
- HIPRA
- HUVEPHARMA
- IZO
- MSD Animal Health
- INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI - a LIVISTO COMPANY
- ZOETIS Italia



La salute animale per la salute dell'uomo

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



PREFAZIONE

Con vero piacere scrivo la prefazione degli Atti del LVI Convegno nazionale e del II Simposio Scientifico che ha visto un cambio di organizzazione negli eventi scientifici della nostra Società. Il nuovo consiglio direttivo, scommettendo sulla vivacità dei nostri soci, ha puntato, oltre al più classico convegno nazionale, anche ad una giornata scientifica in cui i soci hanno avuto la possibilità di presentare i propri lavori in maniera esaustiva e in un clima di vivace scambio di idee che ha amalgamato sempre di più i nostri iscritti, giovani e meno giovani. Quest'anno abbiamo ripetuto l'esperienza, visto l'elevato numero di presentazioni proposte l'anno passato, dimostrando ancora come i patologi aviari italiani siano impegnati costantemente nella ricerca raggiungendo eccellenze scientifiche riconosciute anche all'estero.

Il convegno nazionale, tenutosi a Forlì il 6-7 Aprile scorso, ha affrontato lo stato sanitario delle specie avicole allevate nel territorio nazionale con una relazione finale di aggiornamento sugli episodi di Influenza Aviaria che avevano interessato il nostro Paese. Ringrazio come sempre gli Autori delle relazioni che, insieme ai colleghi di "campo", sono sempre chiari e puntuali nel mostrare le patologie circolanti nei nostri allevamenti, argomenti trattati probabilmente solo dalla nostra Società Scientifica. Il prosieguo del convegno ha visto come titolo le "Malattie respiratorie virali nel settore avicolo: aggiornamenti diagnostici ed epidemiologici e strategie di controllo"; i relatori hanno affrontato le principali problematiche legate alla Laringotracheite Infettiva, i Metapneumovirus e la Bronchite Infettiva. A completamento di questi argomenti un collega straniero ha presentato le strategie adottate dagli allevamenti olandesi per il controllo delle malattie respiratorie e, per ultimo, abbiamo assistito ad una relazione sulle strategie di controllo della qualità dell'aria negli allevamenti, importantissima per coadiuvare gli altri aspetti di profilassi adottati.

SIPA è anche impegnata, ormai da alcuni anni, ad appoggiare Unitalia nel promulgare e sviluppare il "Piano nazionale per l'uso responsabile del farmaco veterinario e per la lotta all'antibiotico-resistenza in avicoltura" che quest'anno viene ulteriormente rinnovato dopo aver raggiunto traguardi che vedono l'avicoltura nazionale come esempio virtuoso nella diminuzione dell'uso degli antimicrobici. Tutte queste attività sono rese possibili, oltre che per l'impegno dei Soci, anche grazie alla presenza costante e discreta di Aziende e Società private sempre pronte ad appoggiarci, anche economicamente, nel promulgare i nostri eventi e che qui pubblicamente ringrazio.

Nella speranza che anche gli incontri di quest'anno raccolgano il consenso di tutti, colgo l'occasione per salutare e ringraziare tutti i soci che ci appoggiano nelle nostre iniziative.

Milano, 02 luglio 2017

Dott. Guido Grilli
Presidente SIPA

ATTI DEL LVI CONVEGNO ANNUALE

INCONTRO

**“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:
focus sulle principali malattie
osservate durante il 2016”**

Forlì, 6 Aprile 2017



RELAZIONE STATO SANITARIO BROILERS NEL 2017

Dott. Ferdinando Battistoni

Il 2017 è stato un anno particolarmente tranquillo per la situazione sanitaria del pollo da carne, le uniche due patologie che hanno avuto una particolare impennata sono state la Laringotracheite infettiva e l'Enterococchi.

Bronchite infettiva:

Già da un anno le filiere avicole italiane hanno iniziato a vaccinare in incubatoio per Bronchite Infettiva ed in particolare con variante inglese e questo ha tolto tutte le variabili della vaccinazione in allevamento, dal tipo di acqua, allo svuotamento dell'impianto idrico, agli errori sulla tempistica di assetamento, alla mancanza di movimentazione degli animali durante la vaccinazione.

Questo ha portato ad una diminuzione della pressione virale di ceppi circolanti di Bronchite, (QX,Q1, 793B, XQX), una maggiore uniformità di copertura anticorpale e di conseguenza una maggiore salute animale.

Malattia di Gumboro:

Anche per questa patologia, soprattutto nelle zone ormai endemiche le principali filiere avicole hanno iniziato a vaccinare in incubatoio e di conseguenza la pressione virale si è abbassata notevolmente e le problematiche sanitarie si sono ridotte drasticamente.

Metapneumovirus:

La presenza di Metapneumovirus è sempre costante (srotipo B), ma essendo limitata la presenza sul territorio di IBV si sono ridotte le infezioni miste e di conseguenza le infezioni batteriche di origine secondarie.

Laringotracheite infettiva:

Malattia "vecchia" ma sempre attuale. In aumento rispetto all'anno precedente. Colpite tutte le filiere del centro-nord Italia, dalle province di Verona, Mantova, Vicenza, Forlì-Cesena, una parte di Padova e Brescaia e la regione Marche. Si è cercato di ridurre l'infezione con la vaccinazione in incubatoio ma solo questo non basta.

Le filiere avicole devono capire che per superare il problema bisogna rispettare o meglio allungare il vuoto sanitario, dopo avere lavato e disinfettato il focolaio.

La pollina deve essere trasportata su carri telonati in modo da non diffondere l'aerosol di particelle virali.

E' buona norma che le varie filiere informino i colleghi dei focolai in essere per pianificare i ritiri, le immissioni e i futuri piani vaccinali.

Enteriti Virali:

Patologia sempre presente, spesso dovuta a deficienza manageriale.

Solitamente sono infezioni miste da Rota, Astro, Enterovirus-like, causate da mancanza di pulizia e disinfezione in allevamento e mancanza di un buon vuoto sanitario.

Enterococco Cecorum

L'Enterococco Cecorum si localizza a livello di midollo osseo delle ossa lunghe e delle vertebre toraciche e lombari.

Può causare osteomielite con necrosi della testa del femore e di conseguenza animali con difficoltà di deambulazione e formazione di scarti oppure è causa di "kinky-back con animali in posizione di sfinge, con arti divaricati e peso sul porta coda.

Le ipotesi più plausibili per l'incremento dei casi di enterococco possono essere:

- Il non utilizzo della formalina in incubatoio può avere determinato un aumento dell'inquinamento ambientale in camera di schiusa
- La mancanza di igiene delle uova in incubatoio.
- La riduzione dell'uso di betalattamici e sulfamidici e quindi prima inconsapevolmente era controllata?

Clostridium Botulinum

Infezioni sporadiche ma presenti.

Caso Clinico:

In allevamento a 34 gg si notano alcuni animali a terra, a 37 gg 300 morti, animali in stato comatoso

Nessuna lesione anatomo-patologica, paralisi flaccida dei muscoli del collo, delle ali, delle palpebre. Riluttanza a muoversi.

Esami di laboratorio per confermare la diagnosi, siero per prova biologica.

Solitamente per arginare il problema o si asportata in toto la lettiera o si copre totalmente con lettiera vergine.

Sono indicati disinfettanti a base di ipoclorito di sodio, o iodofori ed acido peracetico. Consigliata pirodisinfezione.

Si raccomanda di disinfettare anche le aree esterne.

STATO SANITARIO DELLE GALLINE OVAIOLE 2016-2017

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)

In questa relazione sono brevemente riportate le segnalazioni riguardanti le patologie più frequentemente riscontrate negli allevamenti di galline ovaiole per la produzione di uova da consumo nel corso del 2016 e nei primi mesi del 2017. Obiettivo è quello di riportare quanto dal campo emerge attraverso la viva voce degli operatori del settore.

I dati presentati sono stati forniti dai seguenti colleghi che a tutti gli effetti devono essere considerati coautori della presente relazione.

Luca Bano	IZS delle Venezie, Sezione di Treviso
Ezio Bianchi	Veronesi, Verona
Paola Calabrese	Specialmangimi Galtieri – Bari Modugno
Mauro Castello	Libero professionista, Vercelli
Salvatore Catania	IZS delle Venezie – Padova
Ludovico Dipineto	Università degli Studi di Napoli
Maria Pia Franciosini	Università degli Studi di Perugia
Davide Giovanardi	Laboratorio Tre Valli, Verona
Paola Massi	IZSLER Sezione di Forlì
Antonino Messina	Libero Professionista Sicilia
Ana Moreno Martin	IZSLER, Sezione di Brescia
Antonia Ricci	IZS delle Venezie Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi, Padova
Fabrizio Russo	Libero Professionista, Campania
Alessandro Scolari	Laboratorio La Vallerana, Cremona
Calogero Terregino	IZS Delle Venezie - Centro di referenza nazionale per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle, Patova
Giovanni Tosi	IZSLER Sezione di Forlì
IZSUM Sez. Di Perugia	

Nel complesso il 2016 è stato un anno tranquillo dal punto di vista sanitario, se si eccettuano i timori per la circolazione dei **virus influenzali** appartenenti al sottotipo H5N8 responsabili di numerosi focolai di malattia in Europa e che in Italia hanno interessato (fino ad aprile 2017) principalmente uccelli selvatici e purtroppo allevamenti intensivi di tacchino.

Per quanto riguarda il comparto delle galline ovaiole, notevole interesse ha suscitato il riscontro della **Laringotracheite infettiva aviaria**, segnalata soprattutto nell'Italia settentrionale. La malattia si è presentata in aziende in cui non si praticava la vaccinazione site in prossimità di allevamenti in cui invece la profilassi immunitaria era praticata di routine. Sono state osservate forme acute con punte di mortalità del

30%. I virus responsabili della malattia sono stati riconosciuti come ceppi CEO. Il ricorso ad una vaccinazione con un vaccino ricombinante (Marek-ILT) alla schiusa sembra aver dato buoni risultati, riducendo significativamente la mortalità in caso di successivo ingresso del virus. Dal campo giungono segnalazioni di programmi vaccinali che prevedono una prima vaccinazione ad un giorno di vita con il citato vaccino ricombinate MD-ILT e un successivo richiamo a 5-6 settimane con un tradizionale vaccino somministrato per via oculo-nasale che contiene un ceppo CEO. Questo approccio profilattico sembra ridurre significativamente anche gli inconvenienti legati alla patogenicità residua del ceppo vaccinale della ILT.

Tra le forme respiratorie, ancora ben presente la **Bronchite infettiva**, che i colleghi segnalano però in netto calo in Italia Meridionale rispetto allo scorso anno. I tipi antigenici circolanti sono come gli anni precedenti prevalentemente QX, Q1, 793B, D274, Qx-like. La malattia, che si è presentata spesso con cali della deposizione del 10% e forme complicate da *E. coli* e *Mycoplasma synoviae*, è stata spesso riconducibile all'azione di varianti non ricomprese nel piano vaccinale.

Interessante la segnalazione di alcuni sporadici casi di **Encefalomielite aviare**. Essi sono stati caratterizzati da un calo transitorio della deposizione del 10-15%. I test sierologici effettuati sui gruppi in cui si è manifestata la malattia hanno evidenziato titoli scarsi o assenti e aprono interrogativi circa il reale livello di immunizzazione degli animali dopo la vaccinazione.

Segnalata la circolazione del virus del **Vaiolo aviare** con alcune forme ricorrenti di malattia in alcune aree della Pianura Padana e del delta del Po. In Puglia si riporta un episodio in un allevamento rurale. Con tipiche forme crostose alle zone deplumate della testa e degli arti.

La **Malattia di Gumboro** è stata osservata raramente, in particolare in gruppi non vaccinati dell'Italia settentrionale. Un caso è riportato su pollastre in Campania. La malattia sembra essere legata alla circolazione di ceppi ad elevata patogenicità.

Sporadiche sembrano essere anche le infezioni da **Avipneumovirus** riconducibili sempre all'azione del sierotipo B osservate in Emilia Romagna.

Per quanto attiene le malattie neoplastiche, pressoché assente la **Malattia di Marek** negli allevamenti intensivi.

Sono stati osservati invece alcuni sporadici episodi in cui forme eteroplastiche peduncolate o nodulari erano diffuse al peritoneo, e sacchi aerei. Le neoplasie tendevano a coinvolgere intestino, ovaio e rene, ed erano associate, a volte, ad ascite. Non sembrano essere interessati macroscopicamente fegato e milza. Questi episodi sono stati riportati in Veneto ma anche in Italia Meridionale, soprattutto su galline ovaiole nell'ultima fase del ciclo di produzione. Ridotta era la mortalità.

Sono infine riportati dal dott. Scolari 3 casi di mancata risposta immunitaria alle vaccinazioni. Gli animali, vaccinati, come di seguito riportato risultavano totalmente privi di anticorpi specifici.

1. Vaccinazione nei confronti di EDS76. Una vaccinazione con vaccino inattivato.
2. Vaccinazione nei confronti della Pseudopeste aviare. Due vaccinazioni con vaccino vivo e una con vaccino inattivato.
3. Vaccinazione nei confronti dell'Encefalomielite aviare. Una vaccinazione con vaccino vivo attenuato.

Tra le **malattie ad eziologia batterica** le **Micoplasmosi** continuano ad essere costantemente segnalate, anche se con frequenza apparentemente inferiore agli anni precedenti. La specie più coinvolta più spesso è *Mycoplasma synoviae*, che si associa a forme cliniche con sintomatologia respiratoria e calo della deposizione. Meno presenti i casi di "Apex" sulle uova.

Riportato in netto aumento il ricorso alla vaccinazione nei confronti di questo microrganismo.

Mycoplasma gallisepticum è stato invece segnalato come responsabile di complicazioni vaccinali da Laringotracheite infettiva o da Bronchite infettiva aviare. A volte è riportata la copresenza di *M. gallisepticum* e *M. synoviae* nello stesso gruppo di ovaiole.

In Italia Meridionale *M. synoviae* si conferma la specie prevalente, specialmente in Puglia e Calabria. Tuttavia, *M. gallisepticum* è riscontrato sia pure in minore quantità in tutte le Regioni, dal Lazio alla Puglia dalla Campania, alla Basilicata, e dalla Calabria alla Sicilia.

Secondo molti veterinari di campo tuttavia, è la **Colibacillosi** la malattia più diffusa negli allevamenti intensivi di galline ovaiole. Essa è descritta sia nella forma di colisetticemia che in quella nota come malattia dei sacchi aerei e sindrome del calo della deposizione, caratterizzate da periepatite ed aerosacculite fibrinosa, peritonite, ovarite ed oviduttite fibrino caseosa. Specie nei soggetti in deposizione avanzata si osservava il coinvolgimento del follicolo nell'ovidutto con mummificazione dello stesso e tipico uovo a "buccia di cipolla". I sierotipi più frequentemente coinvolti sono risultati O78 e O2.

I colleghi operanti in Italia del Nord segnalano vari episodi di **Clostridiosi**. Si riporta in particolare un caso descritto dal dott. Bano in cui gli animali presentavano una grave tiflite emorragica in cui non era possibile evidenziare coccidi. Le analisi di laboratorio hanno restituito una positività per *C. perfringens* ad alto titolo.

In controtendenza rispetto a quanto paventato negli anni precedenti, il riscontro oramai occasionale dell'**Artropatia amiloide** attribuibile a *Enterococcus fecalis*. Si segnala un episodio caratterizzato da infezione mista da *E. fecalis* e *M. synoviae*. Entrambi i germi sono stati isolati dalle articolazioni.

Le segnalazioni di **Paseteurellosi** sono state estremamente scarse. Si rileva la presenza del germe in un allevamento ornamentale multispecie in Puglia, caratterizzato da mortalità molto alte che ha coinvolto anatre, e oche oltre a ovaiole e polli da carne. L'allevatore ha conferito gli animali al laboratorio dopo aver praticato un volontario stamping-out.

Per quanto attiene le **infezioni da Salmonella**, è certamente in netto calo il riscontro di *Salmonella gallinarum*. Il piano di monitoraggio per le Salmonelle mobili oramai capillarmente implementato nel nostro Paese ha, invece, consentito di confermare la circolazione di sierovarianti minori, non rilevanti. In calo il riscontro di *Salmonella enteritidis* e typhimurium rispetto agli anni precedenti.

Due casi, infine, di **Corizza infettiva** da *Avibacterium paragallinarum* segnalati da IZSLER, Sezione di Forlì e dal dott. Scolari, e un episodio di malattia in cui era coinvolto *Gallibacterium anatis* riportato dal Dott. Giovanardi.

Tra le tecnopatie, si riporta una certa recrudescenza di episodi di plumofagia e **cannibalismo**. La malattia è segnalata al Nord quanto al Sud Italia ed è responsabile

di gravi perdite negli allevamenti intensivi di ovaiole sia a terra che in batteria. La malattia è associata anche a gruppi con ottime performance produttive e tende a manifestarsi soprattutto nella seconda metà del ciclo di produzione.

Si riporta, inoltre anche la presenza della **Sindrome del fegato grasso emorragico (FLHS)**. La malattia è stata osservata sia i gruppi in batteria che in voliera in veneto e classicamente si è manifestata con aumento del deposito di grasso nel sottocute, in cavità celomatica, e sul fegato. La malattia comporta la rottura dell'organo favorita nei soggetti allevati in voliera dai salti dai posati più alti. Le lesioni anatomopatologiche sono state caratterizzate dalla presenza di un grosso coagulo su uno dei due lobi del fegato. Il secondo dei due lobi si presentava flaccido, fragile e decolorato.

Tra le **malattie parassitarie** si riportano alcuni episodi di **istomoniasi** sia in allevamenti di tipo industriale che rurale. Segnalato un solo caso di **coccidiosi** nel Nord-est e due episodi, successivi all'accasamento delle pollastre ma subito risolti, in Italia Meridionale.

Tra gli ectoparassiti il ***Dermanyssus gallinae*** resta però il problema principale negli allevamenti di ovaiole per la produzione delle uova da consumo. L'acaro continua ad essere presente in moltissime aziende indipendentemente dalla tipologia di allevamento. L'occasione è utile per richiamare tutti gli operatori del settore ad un uso consapevole e corretto degli acaricidi invitando ad implementare programmi integrati di controllo che non prevedano il solo trattamento con molecole sintetiche, al fine di evitare fallimenti delle terapie e ridurre il rischi di insorgenza di fenomeni di resistenza.

PATOLOGIE DEL TACCHINO ANNO 2016-2017

Enrico Dr. Alessandri
Veterinario Aziendale

Quest'anno uno dei problemi che ha colpito il territorio Nazionale è stata l'influenza Aviaria ad alta patogenicità ma sarà il Dr. Terragino che ne parlerà approfonditamente. La mia relazione sarà una carrellata delle principali patologie che abbiamo incontrato in quest'anno, dividendo la mia presentazione in tre grandi capitoli e cioè:

patologie di interesse prevalentemente enterico

patologie di interesse prevalentemente respiratorio

segnalazione di un E.coli lattosio negativo

Patologie di interesse prevalentemente enterico sono state:

clostridiosi, salmonellosi, istomoniasi, coccidiosi, verminosi e non è mancata HEV che ha fatto da padrona provocando forme molteplici di patologie enteriche e non. Dai dati riportati dai principali Laboratori Italiani si evidenziano come l'incidenza della Clostridiosi abbia dato una frequenza di isolati del 75%, salmonellosi 1%, coccidiosi del 30%, istomoniasi del 10% e l'enterite emorragica (HEV) del 100 %.

Patologie di interesse prevalentemente respiratorio sono state:

O.R.T., Reimerella Anatipestifer, P.Multocida, E.coli Aspergilloso e non vanno dimenticati i classici come M.S., M.G., T.R.T e P.M.V.

Sempre dalla raccolta di dati prelevati dai laboratori Italiani, relativamente agli isolati abbiamo riscontrato che:

E.Coli 98%, O.R.T 29%, P.M.14%, Aspergilloso 35%, R.A. 29%. Per le altre forme non abbiamo dati ufficiali.

Volevo segnalare un'infezione da E.Coli, lattosio negativo che colpisce i gruppi di tacchino attorno alla 6°-8° settimana, provocando elevata mortalità fino ad un 30%, degli animali. Questo Agente infettivo è resistente ai principali farmaci in commercio utilizzabili anche alla colistina solfato. Stiamo utilizzando un vaccino stabulogeno che ci sta dando dei buoni risultati con una notevole riduzione della sintomatologia e mortalità.

Concludo lasciando ai colleghi la domanda relativa al fatto che l'età e anche tipica della HEV, per cui siamo di fronte ad un ceppo di Coli diverso ed altamente patogeno, oppure è la HEV che crea questi danni?

I Gran Parents provengono dall'estero e sono stati vaccinati con il vaccino per HEV vivo, in Italia noi non abbiamo tale antigene è possibile che ciò possa provocare tali interferenze?

LE PRINCIPALI PROBLEMATICHE SANITARIE DELLE SPECIE “MINORI” NEGLI ANNI 2016-17

Alessandro Scolari

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

Riassunto

In generale, il quadro delle patologie che hanno colpito in maniera significativa nel corso dell'ultimo anno le cosiddette “specie minori” (faraone, anatidi, specie *Gallus gallus* allevata per produzioni di nicchia, selvaggina allevata per ripopolamento), non si è di molto discostato da quanto si è visto negli anni precedenti. Sono comunque state riportate, dai colleghi operanti in laboratori diagnostici ed in campo, alcune interessanti segnalazioni, che sono di seguito riassunte.

Nelle **faraone** (*Numida meleagris*), tra le patologie presenti nelle prime settimane di vita, si segnala un aumento delle enteriti virali sostenute da Avian Nephritis Virus (fam. *Astroviridae*), a volte in associazione con Rotavirus. I danni causati da questi agenti patogeni sono spesso aggravati da concomitanti infezioni o infestazioni (candidiasi, tricomoniasi e coccidiosi).

Tra le malattie batteriche, oltre alla sempre presente colibacillosi, che si manifesta con setticemie nelle prime settimane di vita e nell'età adulta, si segnala, in soggetti adulti, la presenza di polmoniti e forme setticemiche sostenute da *Pasteurella multocida*. Sono inoltre in forte aumento anche le enteriti batteriche causate da *Clostridium perfringens*.

In faraone riproduttrici di 124 giorni è stato diagnosticato un caso di Malattia Emorragica che ha causato la mortalità del 5% dei soggetti allevati. La presenza di questa malattia in Italia era già stata segnalata nel 1992 da Massi e coll. (*Atti del XXXI Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria*). L'agente eziologico è un Adenovirus, appartenente al gruppo II, lo stesso virus che causa nel tacchino l'Enterite Emorragica e nel fagiano la Marble Spleen Disease. Nelle faraone, le principali lesioni riscontrate sono state: presenza di emorragie petecchiali diffuse sui muscoli, enterite emorragica e milza marmorizzata. La diagnosi è stata confermata con tecnica PCR e con la microscopia elettronica.

Tra le **anatre** si è avuto un aumento dei casi di enterite necrotica con isolamento di *Clostridium perfringens*. La *Pasteurella multocida* è spesso isolata in episodi di setticemia, sia nelle prime settimane di vita che in soggetti più adulti. In alcuni episodi caratterizzati da sintomi nervosi (tremori e torcicollo) è stata isolata dal cervello la *Riemerella anatipestifer*. Tra le malattie virali è ancora abbastanza frequente l'epatite virale da picornavirus in anatroccoli, nei primi giorni di vita, in episodi caratterizzati da elevata mortalità. Alla necropsia si riscontra grave epatomegalia, con colorito ocreo del parenchima epatico e presenza di emorragie petecchiali. Alcuni soggetti manifestano il caratteristico opistotono e, nei gruppi colpiti, si manifesta successivamente disformità.

E' anche segnalata la presenza di reovirus (diagnosticata con PCR) in alcuni gruppi, associata a colisetticemia.

Nelle **oche** sono stati riportati: un caso di setticemia da *Streptococcus gallolyticus* nelle prime settimane e quattro episodi di enterite catarrale con isolamento di *Clostridium perfringens*.

I **capponi** ed i **galletti leggeri**, hanno goduto di una buona annata dal punto di vista sanitario. La difficoltà di pigmentazione, riportata negli anni precedenti concomitante ad infezioni da micoplasmi, non si è manifestata nel corso del 2016.

Le bursiti sternali, invece, continuano ad essere un problema riscontrabile al macello, anche se la presenza della lesione è stata associata più alla cattiva gestione della lettiera che all'azione del *Mycoplasma synoviae*.

Si segnala la comparsa di sintomi respiratori causati dal ceppo Guangdong/xindadi del virus della Bronchite Infettiva. Sono comunque stati riscontrati in questa tipologia produttiva anche i ceppi più noti 793b, M41, QX e Q1.

Il virus della Laringotracheite (ceppo di derivazione vaccinale) ha provocato aumento della mortalità in alcuni allevamenti.

Anche gli allevatori del **settore rurale** e gli **svezinatori** hanno avuto nell'anno trascorso pochi problemi sanitari, i sintomi respiratori riportati nell'anno precedente causati dal ceppo QX del virus della Bronchite Infettiva sono stati prevenuti con la vaccinazione fatta in incubatoio.

Anche le sindromi gastroenteriche nelle prime settimane di vita, solitamente diffuse in questo settore, hanno causato meno problemi nell'anno appena trascorso.

Alcuni episodi di Laringotracheite subacuta e cronica (con basso tasso di mortalità) sono comparsi in gruppi vaccinati in incubatoio, in seguito all'introduzione in allevamento di pollastre asintomatiche vaccinate con vaccini CEO.

Il settore della **selvaggina**, nel quale le principali specie allevate a scopo di ripopolamento sono fagiani, quaglie, starni e pernici rosse, ha beneficiato di alcuni eventi favorevoli, quali l'andamento climatico invernale, che è stato tendenzialmente asciutto e favorevole alla riproduzione, e, a partire dal mese di novembre 2016, il blocco all'importazione di soggetti di cattura provenienti da Francia e Regno Unito, per l'epidemia di influenza aviaria presente nel Nord Europa.

Per questi motivi la produzione selvaggina da ripopolamento nel 2016 è stata superiore del 10% rispetto al 2015. Il prodotto è stato completamente commercializzato, anche se la campagna di vendita, partita bene in estate, si è protratta nel corso dell'inverno.

Nei **fagiani** hanno causato notevoli danni le enteriti virali delle prime settimane, nelle quali è sempre segnalata la presenza di rotavirus, anche se in alcune aree la gravità degli episodi è diminuita. Tra le parassitosi si segnala la presenza di trichomonas di coccidi spesso in associazione, come agenti eziologici di enteriti/tifliti.

La patologia dell'apparato respiratorio è stata caratterizzata dall'aumento delle blefarocongiuntiviti e delle sinusiti causate da *Mycoplasma gallisepticum*. È stato riportato anche un caso di corizza con isolamento di *Avibacterium paragallinarum*.

In soggetti adulti, di età superiore a 90 giorni, sono comparsi sintomi respiratori associati a polmoniti e setticemie, con isolamento di *Avibacterium gallinarum*, *Pasteurella multocida* ed *E.coli*.

Nelle **quaglie** sono sempre presenti le enteriti nelle prime settimane di vita, ad eziologia virale (rotavirus, astrovirus), batterica (e.coli, salmonelle) o parassitaria (coccidi, protozoi flagellati).

Nei gruppi colpiti si evidenzia elevata mortalità e disuniformità. Le lesioni principali

sono a carico dell'intestino tenue (con assottigliamento della parete) e dei ciechi (presenza di tifliti schiumose). I casi sono più gravi quando due o più agenti patogeni, tra quelli sopraelencati, sono presenti in associazione.

È stato segnalato l'isolamento di *Yersinia pseudotuberculosis* in coturnici adulte, in soggetti affetti da enterite catarrale ed epatite con focolai necrotici.

Nelle **starni** e nelle **pernici rosse** le enteriti virali delle prime settimane sono state causate soprattutto da rotavirus e da astrovirus e, come avviene in altre specie, sono state spesso aggravate da coccidiosi e tricomoniasi.

Sono in aumento i casi di micoplasmosi da *Mycoplasma gallisepticum* soprattutto nelle starni, con malattie dell'apparato respiratorio che si manifestano con sinusiti, congiuntiviti e blefariti. In alcuni episodi è stata riscontrata la presenza del *Mycoplasma synoviae*.

Dopo i 30 giorni di età si sono verificati casi di enterite necrotica, con isolamento di *Clostridium perfringens*.

In queste specie, tra le verminosi è molto frequente la capillariosi, che richiede l'effettuazione di ripetuti trattamenti. Sono anche stati riportati alcuni casi gravi di ascariidiasi.

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. Matteo Frasnelli
Dr. Davide Giovanardi
Dr. Emilio Morandini
Dr. Andrea Ragazzini
Dr. Luigi Toffoli
Dr. Giovanni Tosi

ATTI DEL LVI CONVEGNO ANNUALE



CONVEGNO

**“Malattie respiratorie virali
nel settore avicolo:
aggiornamenti diagnostici ed epidemiologici
e strategie di controllo”**

Forlì, 7 Aprile 2017

LARINGOTRACHEITE INFETTIVA AVIARE: DIAGNOSI, CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI E STRATEGIE DI CONTROLLO

Ana Moreno Martin

Reparto di Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi, 9, 25124 - Brescia, Italy

Parole chiave: Laringotracheite infettiva, epidemiologia, strategie di controllo

INTRODUZIONE

La Laringotracheite infettiva (ILT) è una malattia respiratoria acuta e altamente contagiosa che colpisce il pollo. E' diffusa a livello mondiale ed è causa di gravi perdite economiche, legate principalmente a ridotto incremento ponderale, diminuzione della produzione di uova e mortalità. Questa malattia è sostenuta da *Gallid Herpesvirus 1* (GaHV-1), denominato anche virus della laringotracheite infettiva (ILTV), membro della famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*. Il genoma di ILTV è formato da una molecola di DNA lineare, a doppio filamento di circa 155 Kb e si compone di una regione unica lunga (UL) e di una regione unica breve (US) affiancate da due regioni ripetute ed invertite (Thureen *et al.*, 2006). Sebbene ILTV sia stato il primo patogeno aviare a essere controllato con la vaccinazione, la ILT rappresenta ancora una grave minaccia per l'industria avicola, soprattutto nelle aree ad elevata densità avicola (Dufour-Zavala, 2008).

In tutto il mondo sono state segnalate sia forme lievi sia forme gravi di malattia soprattutto nelle galline ovaiole; tuttavia, negli ultimi anni, sono stati descritti, in diversi paesi, numerosi casi con forma clinica lieve ma responsabili di ingenti perdite economiche nei broiler. Poichè non esiste possibilità di trattamento terapeutico, la ILT viene controllata grazie all'applicazione di misure di biosicurezza e/o alla vaccinazione. Tuttavia, il controllo di questa malattia è ulteriormente complicato dalla presenza di infezioni latenti asintomatiche con localizzazione virale nel ganglio del trigemino, che si instaurano dopo la fase acuta della malattia (Hughes *et al.*, 1991). I vaccini utilizzati sono in generale di due tipi: vivi attenuati mediante il passaggio sequenziale in tessuto-culture (*tissue culture origin*, TCO) oppure in uova embrionate di pollo (*chicken embryo origin*, CEO). Va sottolineato che questi vaccini sono stati associati ad una notevole varietà di inconvenienti, come la diffusione del virus vaccinale a soggetti non vaccinati, l'insufficiente attenuazione, la presenza di portatori di virus latente e l'aumento della virulenza del virus con i passaggi *in vivo* (Guy *et al.*, 1991). Negli ultimi anni si sono sviluppati anche vaccini ricombinanti di nuova generazione. I vettori finora sperimentati sono costituiti dal virus attenuato del vaiolo aviare (FPV) e dall'herpesvirus del tacchino (HVT), nel cui genoma sono stati inseriti rispettivamente i geni gB e UL34 nel vaccino FPV e gI e gD nel vaccino HVT (Johnson *et al.*, 2010). I maggiori pregi di questi vaccini sono la mancanza di trasmissione del virus da soggetti vaccinati a non vaccinati, la non presenza di portatori latenti e infine la mancanza di reversione alla virulenza. Gli svan-

taggi sono il conferimento di una immunità prevalentemente umorale e quindi una protezione parziale e un ritardo nell'inizio della risposta immunitaria. Altri vaccini di nuova generazione in via di sviluppo sono i vaccini marker contenenti delezioni genomiche. L'ingegneria genetica infatti può permettere l'attenuazione di un ceppo virale mediante la delezione di un gene come per esempio il gene codificante la glicoproteina gC, la gG, la gJ o la TK del virus della laringotracheite infettiva aviaria. Con questa metodica si ottiene quindi un doppio effetto: attenuazione del ceppo e creazione di un marker. Questi vaccini non sono ancora disponibili nella pratica ma dovrebbero presentare considerevoli vantaggi come il conferimento di una protezione elevata, l'essere privi di virulenza, la possibile inoculazione in ovo e la compatibilità con l'applicazione di una strategia DIVA. In Italia sono ad oggi disponibili in commercio solo i vaccini CEO e il vaccino ricombinate HVT. La vaccinazione con i vaccini tradizionali viene eseguita soltanto negli animali con lunga carriera produttiva, quali riproduttori e galline ovaiole mentre che il vaccino ricombinante può essere utilizzato anche nei broilers.

Anche nel nostro paese si sono verificati casi di forme respiratorie riferibili a ILT responsabili di ingenti perdite economiche. Studi di genotipizzazione condotti sui ceppi isolati da focolai di ILT verificatisi in Europa, Stati Uniti, Sud America e Africa hanno mostrato come la gran parte di essi sia strettamente correlata ai vaccini CEO (Blacker *et al.*, 2011, Moreno *et al.*, 2010, Neff *et al.*, 2008, Oldoni *et al.*, 2008, Sehata *et al.*, 2013). Questo dato consolida l'ipotesi che la causa delle recenti epizootie di ILT sia da ricercare in ceppi di origine vaccinale che possono riacquisire virulenza e persistere in campo (Johnson *et al.* 2010). In questo contesto la differenziazione tra ceppi "wild-type" e ceppi vaccinali è considerata di estrema importanza, sia a fini epidemiologici sia al fine dell'elaborazione di nuove strategie di vaccinazione per poter prevenire nuovi focolai di ILT.

Studi condotti in diversi Paesi, hanno focalizzato l'attenzione sulla possibilità di differenziare i ceppi di campo dai ceppi vaccinali di ILTV mediante *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e questa è divenuta la tecnica di genotipizzazione di questo virus universalmente accettata. Tuttavia, alcuni studi recenti basati sul sequenziamento nucleotidico hanno permesso di evidenziare alcune differenze tra i ceppi vaccinali e/o i ceppi di campo con medesimo *pattern* RFLP (Moreno *et al.*, 2010, Chacon *et al.*, 2009). Questo risultato ha evidenziato la necessità di sviluppare nuove metodiche, basate sul sequenziamento genico, in grado di differenziare i ceppi di campo e i ceppi vaccinali.

Uno studio condotto da Moreno *et al.* (2010), ha rilevato alcune discrepanze tra il genoma di ILTV presente nel *database* e le sequenze di sei geni di due ceppi vaccinali CEO e due ceppi di campo. Nel 2011 è stato sequenziato per la prima volta il genoma completo di un ceppo ILTV vaccinale CEO europeo utilizzando la metodica di next generation sequencing (Lee *et al.*, 2011a). Questa metodica è stata successivamente utilizzata per comparare sequenze del medesimo ceppo vaccinale europeo con due ceppi vaccinali CEO australiani caratterizzati da diversa patogenicità. Questi autori hanno evidenziato come le differenze dal punto di vista genomico siano maggiormente correlate con la diversa origine geografica piuttosto che con differenze nella virulenza. Infatti si sono osservate soltanto 24 sostituzioni nucleotidiche di cui due non sinonime tra i due ceppi

australiani di bassa ed alta virulenza (Lee *et al.*, 2011b). Uno studio recente (Piccirillo *et al.*, 2016), basato nel sequenziamento del genoma completo di due ceppi vaccinali CEO e tre ceppi italiani ILTV di campo (uno isolato da ovaiole nel 1980 e due da broilers nel 2007 e 2011) ha rilevato un'elevata correlazione (>99,9% di identità) tra i vaccini CEO e i ceppi di campo circolanti in Italia già dal 1980.

Autori australiani (Lee *et al.*, 2012) hanno inoltre rilevato nel loro paese la circolazione di ceppi virulenti responsabili di focolai di ILTV ottenuti probabilmente da un fenomeno di ricombinazione tra ceppi vaccinali australiani e di origine europea. Tutti questi risultati hanno destato grande preoccupazione nella comunità scientifica non solo per la diffusione mondiale dei vaccini attenuati per ILTV, ma anche per l'analogia con vaccini attenuati nei confronti di altri herpesvirus e di conseguenza con possibile rischio di comparsa di ceppi ricombinanti virulenti che potrebbero diffondersi con gravi conseguenze.

Situazione epidemiologica

Studi di caratterizzazione e genotipizzazione eseguiti su ceppi ILTV in diversi paesi del mondo hanno rilevato che nella maggior parte dei casi esiste una elevata correlazione tra i ceppi di campo e i vaccini CEO. Il risultato è infatti una progressiva sostituzione dei ceppi ILTV virulenti con i ceppi correlati ai ceppi vaccinali CEO in tutto il mondo, specialmente nei paesi con un'industria avicola sviluppata.

In Italia la situazione epidemiologica risulta sovrapponibile a quanto rilevato in altri paesi con alte concentrazioni avicole e produzioni intensive. Nel corso degli ultimi anni sono state evidenziate nel nostro paese forme respiratorie riferibili a laringotracheite soprattutto in allevamenti di broiler e nell'ultimo anno in allevamenti di ovaiole. Le aree coinvolte sono nelle regioni di Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Molise e Puglia, dove si concentra la maggior parte di allevamenti di pollo da carne e di ovaiole.

Considerato che la maggior parte dei focolai verificatisi è causata da virus indistinguibili dai virus vaccinali mediante RFLP, è stato deciso da diversi autori di definire queste nuove forme con il nome di "Vaccine Laryngotracheitis" (VLT) (Dufour-Zavala, 2008). In diversi paesi la comparsa di VLT negli allevamenti industriali di broiler è considerata uno dei problemi sanitari emergenti, responsabile di ingenti perdite economiche.

La sintomatologia clinica è caratterizzata da congiuntivite, tosse, marcata dispnea ed espettorazione di muco, fibrina e sangue. Per quanto riguarda la virulenza, i ceppi di ILTV si distinguono in ceppi ad alta patogenicità, responsabili di morbilità e mortalità elevate degli animali colpiti, e ceppi a bassa patogenicità che causano un'infezione lieve, spesso asintomatica.

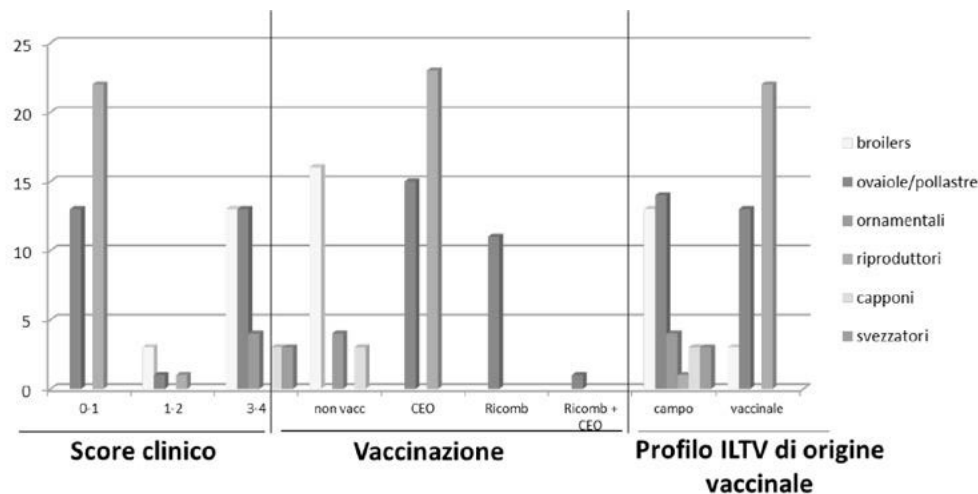
I casi osservati nel nostro paese hanno riguardato fondamentalmente broiler sopra 35 gg di età e sono stati caratterizzati da sintomatologia delle prime vie respiratorie con tosse, dispnea, espettorazione di muco, fibrina e a volte sangue. Le lesioni macroscopiche più frequenti sono state edema e congestione dell'epitelio della congiuntiva, sinusite, tracheite di variabile entità con presenza di essudato mucoide o emorragico nei casi più gravi. La mortalità è variata da bassa (<10%) a molto bassa (0,5-2%).

Allo scopo di classificare i casi clinici in modo obiettivo, è stato messo a punto un sistema di *clinical score* che prevede l'assegnazione di un punteggio da 1 a 4 quando più del 50% degli animali manifestano i seguenti segni clinici:

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

Sulla base delle differenze rilevate tra ceppi di campo e vaccini CEO (Piccirillo et al., 2016) sono stati messi a punto dei protocolli di end-point PCR in grado di differenziare in modo rapido e meno indaginoso i ceppi ILTV identificando due profili, uno tipico dei ceppi di campo di origine vaccinale (VLT-C) e l'altro dei ceppi vaccinali CEO (VLT-V). La tipizzazione dei ceppi ha definito due profili con l'inserzione (D nel ORFC) e le 3 mutazioni (G-A nel ORF E; R-H nel UL36; K-R nel US8) interpretate come "profilo di discriminazione": ins-A-H-R per ceppi riconducibile al ceppo VLT-C, no ins-G-R-K per ceppi riconducibili a VLT-V. Sono stati identificati due profili ben distinti senza evidenziare profili misti. Utilizzando questa metodica sono stati tipizzati 78 campioni risultati positivi alla PCR per ILTV nel 2016. I campioni erano divisi in: 16 originati da broilers, 27 da ovaiole/pollastre, 23 da riproduttori, 4 da ornamentali, 3 da capponi e 5 da svezzatori/commercianti. I dati dei campioni (score clinico, vaccinazione, tipo di vaccino utilizzato) e i risultati della tipizzazione sono riassunti nel grafico n. 1.

Grafico 1 - Dati e tipizzazione dei campioni positivi alla PCR per ILTV nel 2016



Strategie di controllo

Il controllo della malattia si basa sull'applicazione di misure di biosicurezza e sulla vaccinazione con vaccini vivi attenuati CEO o TCO (Dufour-Zavala, 2008; Chin et al., 2009). Questi vaccini, soprattutto i vaccini vivi attenuati CEO, si sono mostrati particolarmente efficaci quando somministrati in modo corretto. Tuttavia, è stato dimostrato che questi vaccini, in particolare i vaccini CEO, possono riacquisire virulenza con il passaggio da animale ad animale, essere trasmessi da animali vaccinati ad animali non vaccinati e stabilire latenza in polli apparentemente in buona salute. Questi vaccini sono tuttavia stati registrati in Italia soltanto per le categorie riproduttori e ovaiole. Per i polli da carne il controllo della malattia si basa quindi unicamente sull'applicazione di misure di biosicurezza e di gestione dei focolai.

Allo scopo di stabilire delle misure di prevenzione e di definire un protocollo di gestione dei focolai si è creato nella regione Lombardia un gruppo di lavoro che include le categorie professionali direttamente coinvolte. Questo gruppo ha il compito di discutere e sviluppare strategie di cooperazione, che coinvolgano anche l'industria, con l'obiettivo di definire le procedure e le misure di biosicurezza da applicare nella gestione dei focolai di ILTV. Il fatto che le decisioni siano prese congiuntamente da tutte le figure coinvolte attraverso i loro rappresentanti, probabilmente rende l'adozione delle misure previste più facilmente applicabile.

Il protocollo di intervento per il controllo della malattia e gestione dei focolai prevede le seguenti fasi:

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

- 1- Carico controllato consiste nella macellazione degli animali sani presenti in allevamento. Il carico degli animali dovrebbe essere predisposto come ultimo ritiro della giornata. Inoltre il capannone interessato dalla malattia dovrebbe essere tenuto in osservazione fino alla remissione della sintomatologia e successivo avvio alla macellazione.
- 2- Pollina e gestione dei morti. Invio dei morti a un'azienda autorizzata alla fine dell'episodio e dopo la macellazione degli animali una volta ristabiliti. Stoccaggio della pollina in ricoveri coperti adeguati in area di proprietà dell'allevatore.
- 3- Pulizia e disinfezione. Lavaggio e successiva disinfezione e rispetto di un vuoto sanitario di almeno 21 g dopo l'avvenuto lavaggio e disinfezione.
- 4- Controllo del personale di allevamento. In particolare il personale a contatto con gli animali, compreso quello impegnato nel ritiro, dovrà essere dotato di indumenti protettivi, tute e stivali. Un ulteriore accorgimento sarebbe quello di evitare di chiamare personale per la gestione di muletti o pale meccaniche, ma se possibile utilizzare gestione familiare. Tutto il personale a contatto con gli animali dovrebbe inoltre evitare contatti con altri allevamenti.

L'introduzione di animali apparentemente sani ma portatori di virus di campo in fase latente costituisce uno dei punti critici per l'introduzione dell'infezione in allevamento. Si raccomanda pertanto particolare attenzione nell'acquisto e immissione di nuovi soggetti in allevamento, operazione che dovrebbe essere fatta con estrema oculatezza o quanto possibile evitata.

Il monitoraggio e la rapida diagnosi di tutte le forme cliniche respiratorie è un altro aspetto da non sottovalutare. La rapida identificazione dei casi di ILTV, la tempestiva applicazione di tutte le misure di controllo e di gestione dei focolai e infine l'immediata segnalazione rimangono i punti cardine per il controllo della diffusione della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Blacker, H.P., N.C. Kirkpatrick, A. Rubite, A. O'Rourke, A.H. Noormohammadi. Epidemiology of recent outbreaks of infectious laryngotracheitis in poultry in Australia. *Aust. Vet. J.*, 89:89-94. 2011.
2. Chacón, J.L., A.J. Piantino Ferreira. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine*, 27:6731-6738. 2009.
3. Chin R.P., Garcia M., Corsiglia C., Riblet S., Crespo R., Shivaprasad H.L., Rodriguez-Avila A., Woolcock P.R., Franca M. Intervention strategies for laryngotracheitis: impact of extended downtime and enhanced biosecurity auditing. *Av Dis.* 53: 574-577.
4. Dufour-Zavala, L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. *Avian Dis.*, 52:1-7. 2008.
5. Guy, J.S., H.J. Barnes, L.G. Smith. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis.*, 35:348-355. 1991.
6. Hughes, C.S., R.A. Williams, R.M. Gaskell, F.T.W. Jordan, J.M. Bradbury, M. Bennet, R.C. Jones. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. *Arch. Virol.*, 121:213-218. 1991.
7. Johnson, D.I., A. Vagnozzi, F. Dorea, S.M. Riblet, A. Mundt, G. Zavala, M. García. Protection against infectious laryngotracheitis by in ovo vaccination with commercially available viral vector recombinant vaccines. *Avian Dis.*, 54(4): 1251-9. 2010.
8. Lee, S-W., Markham, J.F., Petermann, I., Noormohammadi, A.H., Browning, G.F., Ficorilli N.P., Hartley, C.A., Devlin, J.M. First complete genome sequence of infectious laryngotracheitis virus. *BMC genomics*, 12:197. 2011a
9. Lee, S-W., Devlin J.M., Markham J.F., Noormohammadi A.H., Browning G.F., Ficorilli N., Hartley C.A., Markham P.F. Comparative analysis of the complete genome sequences of two Australian origin live attenuated vaccines of infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*, 29: 9583-9587. 2011.
10. Lee, S-W., Markham P.F., Coppo M.J.C., Legione A.R., Markham J.F., Noormohammadi A.H., Browning G.F., Ficorilli N., Hartley C.A., Devlin J.M. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*: 337, 2012.
11. Moreno, A., Piccirillo A., Mondin A., Morandini E., Gavazzi, L., Cordioli P. Epidemic of infectious laryngotracheitis in Italy: Characterization of virus isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism and sequence analysis. *Av Dis.*, 54:1174-74. 2010.
12. Neff, C., C. Sudler, R.K. Hoop. Characterization of western European field isolates and vaccine strains of avian infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *Avian Dis.*, 52:278-283. 2008.
13. Oldoni, I., A. Rodriguez-Avila, A. Riblet, M. Garcia. Characterization of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) isolates from commercial poultry by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Avian Dis.*, 52:59-63. 2008.
14. Piccirillo, A., Lavezzo E, Niero, G, Moreno A, Massi, P, Franchin, E, Toppo S, Salata C, Palù G. Full Genome Sequence-Based Comparative Study of Wild-Type and Vaccine Strains of Infectious Laryngotracheitis Virus from Italy. *PLoS ONE* 11(2): e0149529.doi:10.1371/journal.pone.0149529
15. Thureen, D.R., C.L. Jr. Keeler. Psittacid herpesvirus 1 and infectious laryngotracheitis virus: comparative genome sequence analysis of two avian alphaherpesviruses. *J. Virol.*, 80:7863-7872. 2006.
16. Shehata, A.A., Halami, M.Y., Sultan, H.H., Abd El-Razik, A.G. & Vahlenkamp, T.W. Chicken embryo origin-like strains are responsible for infectious laryngotracheitis virus outbreaks in Egyptian cross-breed chickens. *Virus Genes*, 46, 423-430. 2013

40 ANNI DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE: COSA ABBIAMO IMPARATO E QUALI SFIDE PER IL FUTURO

Elena Catelli

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (Bologna) Italia

In recent years molecular techniques have moved forward all fields of research on avian metapneumovirus (aMPV). From its first appearance in the late 70s aMPV has spread almost worldwide, causing relevant economic losses and welfare issues in poultry due to respiratory disease and reproductive disorders. Four subtypes of aMPV have been identified so far (A, B, C & D) based on antigenic and genetic differences. Reports of aMPV detections in countries previously considered free, prove that areas of diffusion of the virus are expanding. Comparison of full-length sequences of known aMPV subtypes and hMPV confirmed that subtype C viruses are more closely related to hMPV than to other aMPV subtypes. A new subclassification of metapneumoviruses, grouping aMPV A, B and D as type I, and aMPV C and hMPV as type II has been suggested. Moreover, studies on the fusion (F) protein functions support the existence of differences between aMPV subtypes in pathogenicity and host-tropism spectrum. The species natural hosts of the virus are turkeys, chickens, pheasants, guinea Fowl & Muscovy duck. In the latter species only subtype C infection has been reported.

Studies recently performed gave new insights on pathogenesis and immune-pathogenesis of the infection, and support the higher susceptibility of turkeys to the virus, and the role of aMPV as primary pathogen in chickens. More sensitive molecular diagnostic protocols have been developed which have allowed the widening of the time window of viral detection from the respiratory tract and permitted more prompt and effective diagnosis. Sequencing and comparison of aMPV field detections with vaccine and vaccine progenitor sequences have also allowed differentiation between field and vaccine strains. While disease has been in general effectively controlled by vaccination, reversion to virulence of live vaccines of subtype A and B, and vaccine failures in general have been demonstrated on several occasions. Field and experimental studies, coupled with genome sequencing of field and vaccine strains have allowed to investigate the molecular basis of reversion to virulence and prove the evolution of field strains in avoiding vaccine-induced immunity. Moreover, although aMPV sequences available in web databases are scarce and limited to attachment and, to less extend, F protein genes, phylogenetic analysis reasonably allows to suppose that virus is evolving worldwide. To improve aMPV control strategies both in turkeys and chickens, the vaccination regimes need to be improved on the light of the limits of current vaccines and the evolving molecular epidemiology of the virus. In the last 10 years reverse genetics systems for A, B and C subtypes have been developed and used in basic and applied research, and in particular to develop rationally modified aMPV vaccines or vectored vaccines.

AGGIORNAMENTI SULLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

Paola Massi

Medico Veterinario

IZSLER -Sezione di Forlì-



La Bronchite Infettiva aviare (IBV) è una delle malattie virali del pollame più importanti dal punto di vista economico. Distribuita e diffusa in tutto il mondo, è causata dal Coronavirus della IBV e colpisce i galliformi e non. Il suo impatto economico include perdita della produzione di uova, scarsa qualità del guscio, tuorlo e albume, una crescita rallentata con conseguente scarsa conversione in peso e mortalità nei polli da carne.

Primariamente colpisce l'apparato respiratorio anche se IBV possiede un ampio un ampio range di tropismo tissutale includendo il sistema riproduttivo e renale. Pertanto la patologia e la manifestazione clinica è influenzata dall'organo o dai tessuti coinvolti così come dal patotipo o ceppo del virus coinvolto. La conoscenza dell'epidemiologia dei ceppi prevalenti in una determinata area o regione è importante ai fini del controllo e della sua prevenzione.

Eziologia

La malattia è stata identificata per la prima volta nel Nord Dakota nel 1930, poi diffusa in tutto il mondo. Causata da un virus RNA, a singolo filamento di 27-32 KB di lunghezza. (Lai et al., 1997)

Il virus appartiene alla famiglia *Coronaviridae*, genere *Gammacoronavirus*, ordine *Nidovirales*.

Come altri membri della famiglia Coronavirus il genoma IBV è composto da proteine strutturali e non strutturali.

Le proteine strutturali includono la glicoproteina S o Spike, la glicoproteina M della matrice, la proteina E dell'envelope e la proteina N del nucleocapside.

Queste proteine tutte insieme giocano ruoli fondamentali nelle fasi di attacco virale alla cellula dell'ospite, della replicazione e nell'induzione della malattia.

Di queste, la proteina M è la maggiore proteina di membrana, possiede un ruolo cruciale nella fase di assemblaggio virale attraverso l'interazione fra il ribonucleocapside virale e la glicoproteina S. (Narayanan et al., 2000)

La proteina E, nelle cellule infettate, si localizza a livello del Complesso del Golgi ed è associata integralmente nella fase di formazione dell'velope virale , assemblaggio, costruzione, attivazione della catena ionica che innesca il fenomeno della apoptosi. (Corse et al., 2003)

La proteina N si lega con l'RNA genomico a formare il complesso ribonucleoproteico RNP intervenendo in tal senso nella fase di trascrizione, replicazione, traslazione e presentazione del genoma virale durante la replicazione virale. (Hurst et al., 2010)

La proteina S si compone di due porzioni: la porzione S2 più interna e agganciata alla membrana e la porzione S1 più esterna. La porzione S1 della glicoproteina S gioca un ruolo importante nella fase di attacco virale ed ingresso del virus nella cellula attraverso l'aggancio ai recettori alfa 2,3 dell'acido sialico presenti sulla membrana cellulare ed è considerata determinante per la diversità virale e la conseguente

stimolazione immunitaria. Per questo motivo la proteina S1 viene utilizzata per gli studi di caratterizzazione genomica e per la messa a punto dei vaccini ricombinanti. (Cavanagh D., 1983)

Patogenesi

La patogenesi differisce in funzione dell'apparato colpito e del ceppo virale.

Ospiti sensibili

Sebbene il pollo (*Gallus gallus*) ed il fagiano (*Phasianus spp.*) sono considerati gli ospiti naturali, altri coronavirus IBV-like sono stati identificati in altre specie aviari domestiche e non come il fagiano, tacchino, pavone, gufo, oca, quaglia, anatra e pappagallo Amazzone. Sono state evidenziate somiglianze antigeniche fra il coronavirus del tacchino (TCoV) e l'IBV. (Dea et al., 1989).

Sono stati riscontrati anticorpi anti IBV nell'uomo a stretto contatto con il pollame. (Miller et al. 1968).

Età e predisposizione genetica

Polli di ogni età e razza sono sensibili all'infezione da IBV ma la malattia è più grave nel giovane. Similmente, la resistenza all'infezione aumenta con l'età, così come certe linee leggere bianche sono più resistenti al "challenge" effettuato con il ceppo M41 e questo, forse dovuto al maggior polimorfismo genetico del MHC (complesso maggiore di istocompatibilità). (Bacon et al., 2004)

Recettori RBD

Il dominio recettoriale (RBD) della glicoproteina S1 è determinante nella fase di attacco del virus alla cellula dell'ospite. Pertanto, la variazione di parte della S1 determina il tropismo tissutale e la conseguente virulenza dell'infezione. IBV colpisce la trachea, i reni ed il tratto riproduttivo attraverso l'interazione dell'RBD della glicoproteina S1 con i recettori alfa-2,3- dell'acido sialico presenti sulla superficie cellulare. Conseguentemente, IBV entra nella cellula e rilascia il suo nucleocapside all'interno del citoplasma cellulare, inducendo la replicazione, la costruzione ed il rilascio virale. (Cavanagh D., 2008)

Infezione e Trasmissione

Il virus è trasmesso tramite le secrezioni respiratorie e fecali. Gli oggetti e utensili contaminati possono contribuire alla trasmissione del virus da un gruppo all'altro. Il virus si evidenzia in trachea, reni e Borsa di Fabrizio già 24 ore dopo la trasmissione per aerosol. La natura della persistenza virale non è ancora ben chiara, comunque l'identificazione del virus nelle tonsille cecali fino a 14 settimane e nelle feci fino a 20 settimane dopo l'infezione suggeriscono il ruolo della eliminazione fecale nella trasmissione e persistenza virale. (Alexander et al., 1977)

Periodo d'incubazione

Generalmente il breve periodo d'incubazione varia con la dose infettante e la via d'infezione. Per esempio la via tracheale si associa a 18 ore circa di incubazione e l'inoculazione oculare ha un periodo d'incubazione di circa 36 ore. (Cavanagh D., 2008)

Segni clini e manifestazioni

Nell'ospite, l'infezione iniziale si ha nell'epitelio della ghiandola di Harder, trachea, polmoni e sacchi aerei. Il virus poi si diffonde nei reni o tratto uro-genitale per infezione sistemica. A tal riguardo, la gravità e le caratteristiche cliniche dipendono dall'organo o sistema coinvolto. L'infezione del tratto respiratorio può risultare in segni clinici come lo scolo, lo starnuto e la tracheite. Gli animali colpiti appaiono

sofferenti e con penne arruffate, la perdita di peso e la scarsa crescita. Altri segni sono la congiuntivite, la lacrimazione profusa, l'edema dei tessuti periorbitali. I soggetti infetti possono apparire letargici, dispnoici e riluttanti a muoversi. I ceppi IBV nefropatogeni sono segnalati maggiormente nel pollo da carne. I segni clinici includono la depressione del sensorio, la diarrea, eccessivo consumo di acqua e scarsa crescita con conseguente abbassamento degli indici di conversione. L'infezione del tratto riproduttivo è associata a lesioni dell'ovidutto determinando un decremento della qualità e quantità di uova. Le uova appaiono deformate in vario modo e grado, con guscio rugoso, sbiancato e con tuorlo e albume di consistenza fluida-acquosa. La produzione spesso non rientra negli standard attesi per l'età e la linea genetica in questione, contribuendo così a determinare gravi perdite economiche. (Winterfield et al., 1984)

Lesioni anatomopatologiche e istologiche

A livello necroscopico si osserva edema della mucosa tracheale e bronchiale con secrezione mucoide, congestione ed iperemia in trachea e focali aree di consolidamento del parenchima polmonare. Le lesioni istopatologiche evidenziano perdita delle ciglia, edema, appiattimento dell'epitelio ciliare e infiltrazione linfocitaria.

I ceppi nefropatogeni causano nefrite caratterizzata da rigonfiamento e congestione renale talvolta con grave pallore degli ureteri per la presenza di urati. La coinfezione con ceppi batterici patogeni come l'*Escherichia Coli* può condurre a quadri clinici più complessi, di solito associati con alta morbilità e mortalità. Le lesioni istologiche includono nefrite interstiziale, degenerazione tubolare e infiltrazione eterofila. Quando è colpito il sistema riproduttivo si possono osservare cisti in ovidutto, ipotrofia di parte dell'ovidutto o atrofia ovarica completa. Cisti in ovidutto si osservano in galline nella fase di inizio della deposizione in seguito ad infezioni da IBV molto precoci da pollastra sostenute da ceppi particolari di Bronchite come i QX-like, causa della sindrome delle "False ovaiole". (Chousalkar et al., 2007)

Morbilità e mortalità

La morbilità dovuta a IBV può raggiungere il 100%. La mortalità può raggiungere il 20-25% nei soggetti giovani come risultato di fattori che sono ospite-associati (età, stato immunitario) oppure associati al virus (ceppo, patogenicità, virulenza e tropismo tissutale) o associati all'ambiente (stress da caldo o da freddo, polverosità, umidità e presenza di ammoniaca).

Infezioni batteriche secondarie o coinfezioni con virus immunodepressivi come la Malattia di Marek, la Malattia di Gumboro e il CAV possono aggravare l'infezione. (Gallardo et al., 2012)

Generalmente i ceppi nefropatogeni causano alta mortalità se comparati a ceppi con diversi tropismi.

Diagnosi

La diagnosi di IBV è molto standardizzata. La scelta di un test piuttosto che un altro è condizionata dal tipo di campione, disponibilità dei test e facilità di esecuzione, tempo di risposta, sensibilità e specificità.

Diagnosi indiretta di tipo sierologico

Nel passato i test sierologici come la virus neutralizzazione e l'inibizione della emagglutinazione (H.I.) erano utilizzati per identificare e sierotipizzare i ceppi isolati di IBV. Questi test sono stati utilizzati anche per misurare la protezione immunitaria umorale dopo la vaccinazione. Anticorpi sierotipo specifici sono identificati velo-

cemente con la tecnica H.I. Il test ELISA risulta più sensibile e facile in campo per monitorare la risposta anticorpale alla vaccinazione o all'esposizione del virus selvaggio. Lo svantaggio del test ELISA risiede nella bassa specificità.

Comunque, l'emergere di diversi sierotipi di IBV che non cross reagiscono con i comuni antisieri rende i test sierologici meno applicabili e conclusivi nel classificare nuovi ed emergenti ceppi varianti di IBV.

Isolamento virale

Per il successo dell'isolamento virale è necessario campionare durante la prima fase della malattia e scegliere campioni appropriati. Per ottenere un buon isolamento è raccomandato conservare i tamponi da organi in soluzione tamponata a temperatura controllata di refrigerazione.

I campioni consigliati sono costituiti da tessuti di trachea, rene, proventriglio, tonsille cecali e ovidutto. I tessuti devono essere raccolti sterilmente da soggetti sacrificati o appena deceduti, riposti in contenitori sterili e trasportati al laboratorio a temperatura di refrigerazione controllata.

I tempi ed i costi per diversi passaggi su uova embrionate SPF o su colture cellulari limita l'uso dell'isolamento virale come metodi di prima scelta.

La maggior parte dei virus IBV crescono bene quando inoculati in cavità allantoidea di embrioni di 9-10 giorni. A volte sono necessari più passaggi a fondo cieco per ottenere l'isolamento e la replicazione virale. Le lesioni caratteristiche sono il nanismo, l'arrotolamento ed il piumino arricciato dell'embrione. Altri substrati per l'isolamento virale sono le colture cellulari e le colture d'organo

Tecniche diagnostiche molecolari

In funzione della loro notevole sensibilità e riduzione delle tempistiche, i metodi molecolari come l'RT-PCR, la Real-Time PCR, l'RFLP e la sequenza genomica hanno recentemente sostituito i metodi sierologici ed i metodi convenzionali di isolamento virale.

Sequenza e analisi filogenetica

Per la genotipizzazione, il gene S1 di solito è amplificato usando l'RT-PCR, sequenziato e sottoposto ad analisi bioinformatiche. Quindi gli isolati sono caratterizzati attraverso l'analisi bioinformatica sulla base delle loro correlazioni con sequenze di riferimento disponibili nel database delle sequenze. La mancanza di metodi standardizzati fra laboratori, in particolare rispetto alla lunghezza di segmento del gene S1 che viene utilizzato nell'analisi filogenetica, limita la "genotipizzazione". (Zulperi et al., 2009)

Sierotipi e ceppi varianti

Attualmente coesistono numerosi ceppi classici e ceppi varianti diffusi nei diversi Paesi. Questi ceppi possono essere strettamente correlati fra di loro o molto distanti dal punto di vista genomico, antigenico, sierologico e patogenetico. Le variazioni anche di solo il 5 % nella composizione amminoacidica nella glicoproteina S1 possono portare ad alterare la cross-protezione fra sierotipi strettamente correlati fra di loro. Pertanto la sequenza in S1 è presa in considerazione nello stabilire nuove strategie di controllo. L'OIE raccomanda che la distribuzione dei sierotipi o genotipi debba influenzare la scelta della profilassi vaccinazione all'interno di ogni regione geografica.

Mutazione e Ricombinazione

La mutazione e la ricombinazione sono caratteristiche distintive del genoma virale

dei Coronavirus. Come conseguenza una sottopopolazione virale può evolvere da questi eventi genetici (Jia et al., 1995).

Sebbene sia difficile valutare quanto evolva il genoma IBV, sono state ipotizzate due teorie principali:

- 1) la mancanza nel citoplasma della cellula infettata del sistema enzimatico correttivo dell'RNA polimerasi potrebbe portare ad errori nella replicazione del genoma RNA che risultano in piccole modificazioni a livello di gene della glicoproteina S1 (inserzioni, delezioni nucleotidiche) che si traducono in mutazioni puntiformi.
- 2) L'uso dei vaccini vivi attenuati o la presenza di infezioni multiple da diversi sierotipi IBV contribuisce a processi di ricombinazione genica che favoriscono l'insorgenza delle nuove varianti con diversa patogenicità e virulenza. Le regioni che codificano per le proteine non strutturali 2,3 e 16 e per la glicoproteina strutturale S1 esprimono il maggior grado di ricombinazione. (Thor et al., 2011)

Risposta immunitaria nei confronti della IBV

Immunità passiva

Gli anticorpi di derivazione materna (MDAs) sono importanti nella prima fase protettiva contro gli agenti infettanti. Il grado di protezione varia con il titolo e l'omogeneità anticorpale. Approssimativamente il 97% dei soggetti con MDAs sembrano protetti nei confronti di IBV ad un giorno di età. Comunque questa protezione decade del 30% entro 7 giorni di vita, dimostrando una durata limitata della protezione.

Immunità innata

Importante, come gli anticorpi materni, nella prima linea di difesa. Questa risposta si traduce in modelli molecolari patogeno-associati attraverso recettori specifici di ricognizione che sono presenti nelle cellule immunitarie come le cellule dendritiche, i macrofagi, i linfociti e molte cellule non immunitarie come le cellule endoteliali, le cellule mucosali e i fibroblasti. Molto importante, la risposta dell'interferone tipo I che è caratterizzata dalla secrezione di alfa e beta interferone del pollo che fornisce una risposta rapida ed efficiente nei confronti della replicazione virale attraverso l'attivazione di dei macrofagi e delle cellule natural killer che inducono la risposta immunitaria adattativa. La risposta da interferone tipo II che è caratterizzata dalla secrezione di gamma interferon è prodotta dall'attivazione delle cellule NK, cellule dendritiche e T-linfociti CD4+ CD8+. Questo comporta l'adesione leucocitaria, l'attivazione delle cellule NK e la presentazione dell'Antigene a macrofagi e cellule dendritiche con conseguente espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC-1) e lo sviluppo della risposta adattativa.

Immunità umorale

La risposta immunitaria umorale è associata con l'inibizione della replicazione virale ed è correlata con il titolo anticorpale IBV-specifico. La risposta anticorpale che segue la vaccinazione per IBV è dimostrata nel siero e nelle secrezioni lacrimali. Studi hanno dimostrato che sia gli anticorpi circolanti IgA e IgG e mucosali IgA sono essenziali nel determinare la clearance della circolazione virale. Le IgA sono fondamentali a livello mucosale nel contrastare il virus nella sua via di ingresso principale. Le IgM appaiono 5 giorni dopo l'infezione, raggiungono il picco a 8-10 gg. e scompaiono intorno ai 18 giorni, mentre cominciano a comparire le IgG e successiva eliminazione del virus.

Risposta cellulo-mediata

La risposta della proteina specifica del gene N è associata all'attivazione dei linfociti citotossici che sono responsabili della clearance dell'infezione. La risposta cellulare raggiunge il picco dopo 10 giorni, in correlazione con un decremento della sintomatologia clinica e con la clearance del virus dal polmone. In seguito alla vaccinazione specifica sono stati riportati aumenti significativi delle cellule CD4+ e CD8+ a testimonianza della risposta cellulo-mediata. La fase di clearance virale in seguito ad infezione è associata all'attivazione dei linfociti natural Killer (NK) (Timms et al., 1981).

Risposta mucosale

La replicazione da IBV nelle ghiandole di Harder e congiuntiva influenza lo sviluppo della risposta immunitaria mucosale che è caratterizzata dalla secrezione delle IgA specifiche. Questa risposta è stata correlata con la replicazione del tessuto linfoide e conseguente induzione della risposta CTL. Una sola vaccinazione oculare con un vaccino ricombinante fra proteina N e proteina S1 è in grado di indurre una risposta cellulo-mediata senza vaccinazioni booster o adiuvanti, dimostrando di essere protetti verso l'infezione con un ceppo virulento (Meir et al., 2012).

Vaccinazione IBV

Vaccini vivi attenuati

Costituiscono la prima generazione di vaccini impiegati per il controllo della IBV in campo. Questi vaccini sono disponibili in commercio per l'applicazione in acqua di bevanda o per via spray a 1 giorno di vita o entro la prima settimana. Dal momento che la stimolazione immunitaria è di breve durata, deve seguire una vaccinazione booster dopo 2-3 settimane con lo stesso antigene o con altre combinazioni antigeniche. La maggior parte dei vaccini vivi attenuati sono derivati da ceppi virulenti come il Massachusetts con i ceppi M41, DutchH52 e H120, sebbene vengano affiancati da vaccini con ceppi varianti in virtù delle diverse situazioni epidemiologiche e dei sierotipi prevalenti nelle diverse regioni interessate. Lo schema vaccinale I vaccini vivi vengono utilizzati nei soggetti giovani e come booster negli animali a lunga vita. Alcune delle limitazioni dei vaccini vivi attenuati includono possibili reversioni alla virulenza, danneggiamento tissutale e interferenza con gli MDA. Un'altra limitazione risiede nella possibilità di ricombinazione virale con ceppi IBV di campo facendo emergere nuovi sierotipi (Lee et al., 2012).

Vaccini inattivati

Utilizzati in combinazione con i vaccini vivi attenuati. Questi vaccini sono somministrati per via parenterale per inoculazione intramuscolare o sottocutanea negli animali a lunga vita (galline ovaiole o riproduttori). Questi vaccini, a differenza dei vivi, inducono solo una risposta immunitaria umorale ma non cellulo-mediata. Pertanto richiedono un "priming" con vaccini vivi attenuati, l'aggiunta di adiuvanti e più somministrazioni (Ladman et al., 2002). La pratica della inoculazione, se non correttamente eseguita, può ingenerare reazioni locali nel punto di inoculazione con formazione di granulomi sottocutanei e muscolari.

Vaccini ricombinanti

Vaccini a vettore virale

E' stato molto studiato il modello del virus adenovirus come vettore per la sua capacità di variazione di tropismo e per la sua persistenza nella cellula senza causare patologia. In questo vettore c'è la possibilità di esprimere solo alcune subunità pro-

teiche immunogene del virus IBV. Questi vaccini a vettore inducono un aumento significativo della risposta immunitaria (Tatsis et al., 2004).

Vaccini peptidi a subunità

Questa tecnologia richiede l'utilizzo di segmenti o parti delle proteine virali per indurre la risposta immunitaria specifica. Sono costituiti da peptidi o porzioni genomiche che codificano per gli epitopi immunogeni. Epitopi contenuti all'interno dei geni S1 ed N sono stati scelti per l'induzione degli anticorpi neutralizzanti e per la risposta CTL. Questi vaccini sintetici a peptidi vengono ancora studiati a livello sperimentale anche se si dimostrano promettenti per il controllo della IBV (Yang et al., 2009).

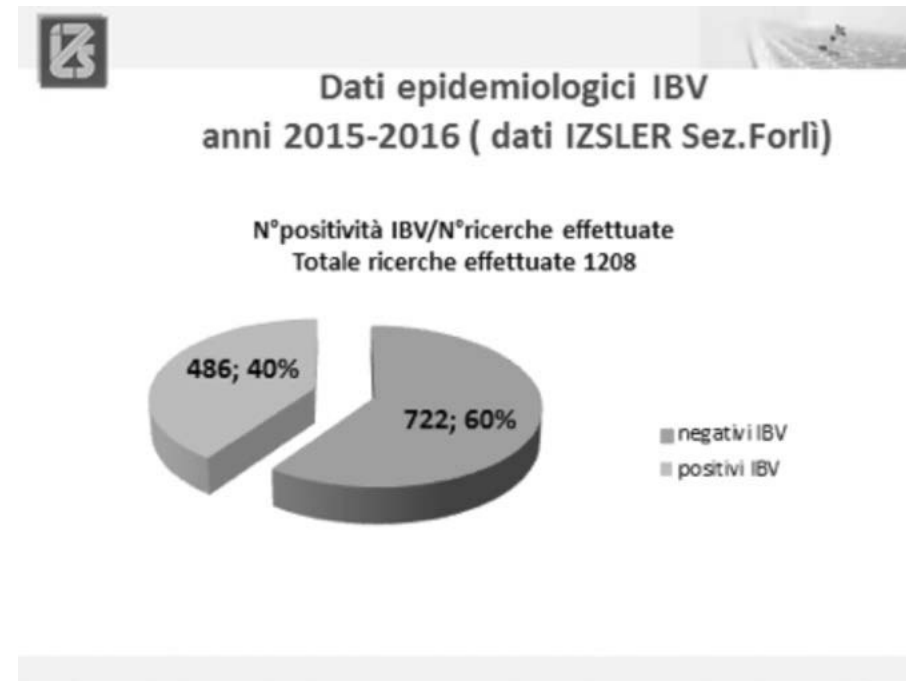
Vaccini a DNA plasmidico

I vaccini a DNA usano un plasmide contenente il gene che codifica per una proteina immunogena di interesse. Sono vaccini prodotti solo su base sperimentale.

Vaccini a reversione genetica

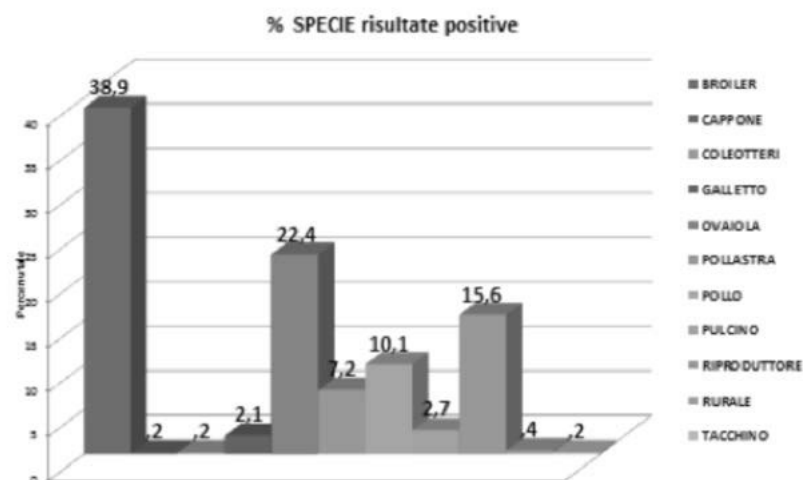
Utilizzano una nuova tecnologia di manipolazione di uno o più geni virali. E' molto utilizzata di recente. Per esempio, un ricombinate, vaccino BeauR-IBV è stato recentemente prodotto sostituendo la glicoproteina antigenica S1 di un ceppo apatogeno con un altro gene S1 rispettivamente da ceppi patogeni M41 e 4/91. Questa modificazione è risultata in una risposta immunitaria protettiva senza usare il ceppo patogeno BeauR. Il vantaggio di questi vaccini a reversione genetica consiste nella mancanza di interferenza con immunità preesistente, e nella impossibilità di subire fenomeni di reversione alla virulenza quando somministrati. (Armesto et al., 2011)

Indagine epidemiologica sui ceppi circolanti in Italia negli anni 2015-2016





Dati epidemiologici IBV anni 2015-2016 (486 campioni positivi)

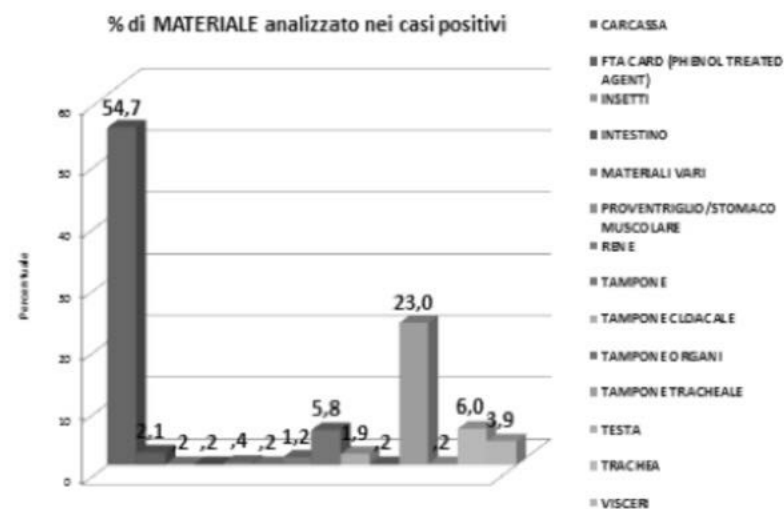


Dati epidemiologici IBV anni 2015-2016

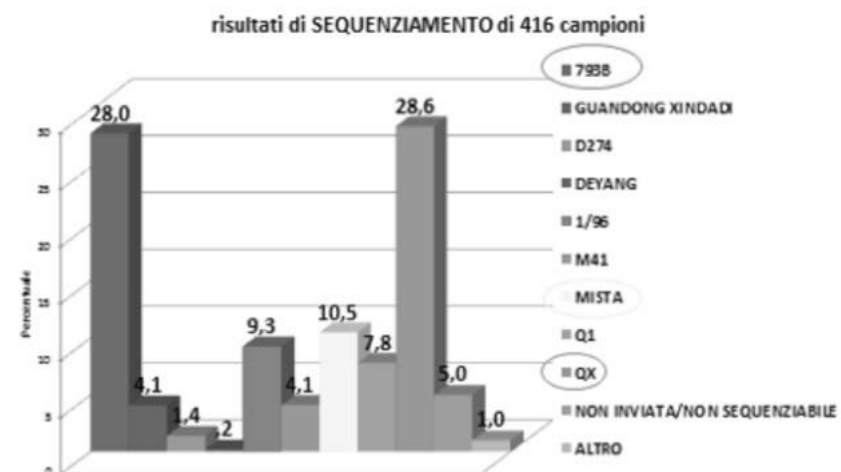
- Percentuali di campioni positivi sul territorio italiano
- 486 campioni di IBV positivi
- 16 Regioni coinvolte
- 70% Regioni del Nord



Dati epidemiologici IBV anni 2015-2016 (486 campioni positivi)

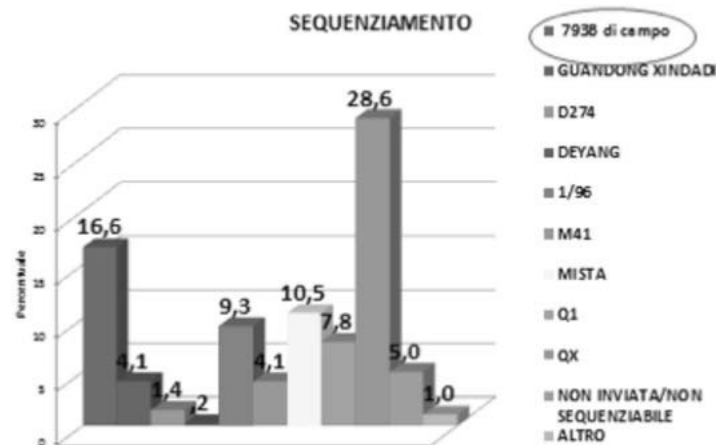


Dati epidemiologici IBV anni 2015-2016





Dato corretto estraendo i 793B vaccinali



BIBLIOGRAFIA

- Armesto M., Evans S., Cavanagh D., Abu-Median A.B., Keep S., Britton P. A recombinant Avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. *PLoS ONE*. 2011; 6(8).
- Bacon L.D., Hunter D.B., Zhang H.M., Brand K., Etches R. Retrospective evidence that the MHC of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens. *Avian Pathology*. 2004; 33(6): 605-609.
- Cavanagh D., Gelb J. *Disease of Poultry*. 12th. 2008; 117-135.
- Cavanagh D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. *Journal of General Virology* 1983;62(12): 2577-2583
- Choulsalkar K.K., Roberts J.R. Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum commercial laying hens. *Veterinary Microbiology*. 2007; 122(3-4): 223-236.
- Course E., Machamer C.E. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E protein mediate their interaction. *Virology*. 2003; 312 (1): 25-34
- Dea S., Tijssen P. Detection of turkey enteric coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay and differentiation from other coronavirus. *American Journal of Veterinary Research*. 1989; 50(2): 226-231.
- Gallardo R.A., Van Santen V.L., Toro H. Effects of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus-induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and genotypic drift

- Hurst K.R., Ye R., Goebel S.J., Jayaraman P., Masters P.S. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *Journal of Virology*. 2010; 84(19): 10276-10288.
- Jackwood M.W., Hall D., Handel A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronavirus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(6): 1305-1311.
- Jia W., Karaca K., Parrish C.R., Naqi S.A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Archives of Virology*. 1995;140(2): 259-271.
- Ladman B.S., Pope C.R., Ziegler A.F., et al. Protection of chickens after live and inactivated virus vaccination against challenge with nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Disease*. 2002; 46(4): 938-944.
- Lai M.M., Cavanagh D. The molecular biology of coronavirus. *Advances in Virus Research*. 1997;48: 1-100
- Lee S.W., Markham P.F., Coppo M.J.C. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*. 2012; 337(6091): 188.
- Meir R., Krispel S., Simanov L., Eliahu D., Maharat O., Pitcovsky J. Immune responses to mucosal vaccination by the recombinant S1 and N proteins of infectious bronchitis virus. *Viral Immunology*. 2012; 25(1): 55-62.
- Miller L.T., Yates V.J. Neutralization of infectious bronchitis virus human sera. *American Journal of Epidemiology*. 1968; 88(3): 406-409.
- Narayanan K., Maeda A., Maeda J., Makino S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cell. *Journal of Virology*. 2000; 74(17):8127-8134
- Tatsis N., Ertl H.C.J. Adenovirus as vaccine vectors. *Molecular Therapy*. 2004; 10(4): 616-629.
- Thor S.W., Hilt D.A., Kissinger J., Paterson A.H., Jackwood M.W. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses*. 2011; 3(9): 1777-1799.
- Timms L.M., Bracewell C.D. Cell mediated and humoral immune response of chickens to live infectious bronchitis vaccines. *Research in Veterinary Science*. 1981; 31(2): 182-189.
- Winterfield R.W., Thacker H.L., Badyack S.F. Effects of subtype variations in the Holland strain of infectious bronchitis virus when applied as a vaccine. *Poultry Science*. 1984; 63(2): 246-250.
- Yang T., Wang H.N., Wang X. et al. The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multi epitope based peptide vaccines. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2009; 73(7): 1500-1504.
- Zulperi Z.M., Omar A.R., Arshad S.S. Sequence and phylogenetic analysis of S1, S2, M and N genes of infectious bronchitis virus isolates from Malaysia. *Virus Genes*. 2009; 38(3): 383-391.

LA TECNOLOGIA DI CONTROLLO DELLA QUALITÀ DELL'ARIA NELL'ALLEVAMENTO AVICOLO: PASSATO, PRESENTE E FUTURO

Ilaria Fontana

Dipartimento di Scienze Politiche e Ambientali, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133, Milano

ABSTRACT

La richiesta di carne di pollo è in continua crescita sia a livello nazionale sia globale. L'impellente e improvvisa necessità di incrementare la razione alimentare di proteine nobili ha portato, nel secondo dopoguerra, allo sviluppo di un'agricoltura e di una zootecnia a carattere intensivo. Le aziende intensive di polli da carne consentono di allevare ad elevate densità un ingente numero di animali in cicli di produzione molto brevi. Negli ultimi anni infatti, il numero di animali per allevamento è cresciuto ma al contempo si è accorciato il ciclo di produzione che ad oggi è generalmente di 42 giorni per avere animali a fine ciclo di circa 2,5 kg di peso. Contemporaneamente, l'opinione pubblica e quindi dei consumatori, esercita una forte pressione sul sistema intensivo pretendendo livelli di benessere sempre più elevati. L'allevamento dei polli da carne è infatti normato a livello europeo con la legge 2007/43/CE per quanto riguarda il benessere, la salute e l'ambiente in cui gli animali sono allevati. La relazione tra condizioni ambientali e produttività è indiscutibile; infatti, gestire correttamente l'ambiente in cui gli animali sono allevati permette di raggiungere elevati livelli di benessere incrementando le performance dell'allevamento. Vista l'importanza dell'allevamento a livello mondiale, negli ultimi anni sono state sviluppate numerosi strumenti per il monitoraggio automatico ed in tempo reale di diversi aspetti dell'allevamento avicolo (de Moura D. et al., 2008; Aydin et al., 2014). Per quanto riguarda la gestione del microclima l'allevamento del pollo da carne è quello più automatizzato. Infatti, temperatura, umidità relativa e azionamento dell'impianto di ventilazione sono regolati mediante sensori automatici. La gestione del microclima interno all'allevamento è di fondamentale importanza poiché il raggiungimento di alte performance è fortemente influenzato da parametri ambientali come temperatura interna, umidità relativa, ventilazione, presenza di gas nocivi (NH_3) e polverosità. Una cattiva gestione della temperatura e dell'umidità relativa può compromettere la qualità della lettiera, favorendo l'insorgenza di patologie podali e zoppie (Tullo et al., 2017). Parallelamente, una cattiva gestione della ventilazione non consente un adeguato allontanamento della polvere e di gas nocivi e irritanti come l' NH_3 , favorendo l'insorgenza di patologie respiratorie. Il particolato è costituito da particelle aero-disperse di diversa granulometria, densità e forma in grado di trasportare materiale organico avente svariate origini (piume, pollini, spore, feci, batteri etc.). Le cosiddette polveri sottili destano grande preoccupazione per quanto riguarda la tutela della salute sia degli animali sia degli operatori. Queste particelle una volta inalate, poiché difficilmente espulse, a lungo andare possono dare luogo a processi infiammatori a carico dell'apparato respiratorio. A livello sanitario, le patologie respiratorie rappresentano per l'allevatore una problematica rilevante, non solo per i costi dei trattamenti ma anche per il contenimento e l'individuazione precoce di tali patologie. In questo contesto si inserisce la Zootecnia di Precisione o Precision Li-

vestock Farming (PLF) il cui scopo è quello di introdurre in azienda strumenti automatici di gestione volti a monitorare il benessere degli animali, la loro salute, le loro produzioni e l'impatto ambientale (Guarino, 2005). La PLF permette di rispondere alle nuove esigenze attraverso tecnologie che forniscono allerte precoci (early warning). L'utilizzo di sistemi di riconoscimento precoce ed automatico delle patologie permette il trattamento tempestivo e la riduzione delle quantità di antibiotici usate per la terapia. Questo non solo corrisponde ad una riduzione delle spese per i farmaci veterinari, ma rientra nelle strategie di intervento per contrastare i fenomeni di antibiotico resistenza. Diversi studi hanno confermato le potenzialità della Zootecnia di Precisione nel rendere più sostenibili le aziende zootecniche. La PLF è in costante sviluppo e miglioramento ed in futuro saranno svolti ulteriori studi per migliorare le funzionalità della sensoristica presente in allevamento; si cercherà infatti di ridurre i livelli di polveri e sostanze inquinanti negli allevamenti avicoli, così da aumentare il benessere e la salute degli animali. Concludendo, si può affermare che la Zootecnia di Precisione risulta essere un importante strumento che affianca gli allevatori nella gestione di tutte le fasi dell'allevamento.

Aydin, A., C. Bahr, S. Viazzi, V. Exadaktylos, J. Buyse, and D. Berckmans. 2014. "A Novel Method to Automatically Measure the Feed Intake of Broiler Chickens by Sound Technology." *Computers and Electronics in Agriculture* 101 (February): 17–23. doi:10.1016/j.compag.2013.11.012.

Daniella Jorge de Moura, Irenilza de Alencar Nääs, Elaine Cangussu de Souza Alves, Thayla Morandi Ridolfi de Carvalho, Marcos Martinez do Vale, and Karla Andrea Oliveira de Lima. 2008. "Noise Analysis to Evaluate Chick Thermal Comfort." *Scientia Agricola* 65 (4): 438–43. doi:10.1590/S0103-90162008000400018.

Guarino, M. (2005). La zootecnia di precisione cambierà il nostro futuro? (Livestock precision farming will change our future?). *Informatore zootecnico* 18-21.

Tullo, E., I. Fontana, A. Peña Fernández, E. Vranken, T. Norton, D. Berckmans, and M. Guarino. 2017. Association between environmental predisposing risk factors and leg disorders in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 95:1512-1520.

ATTI DEL II° SIMPOSIO SCIENTIFICO

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Parma, 22 Settembre 2017



VALUTAZIONE FENOTIPICA E GENOTIPICA DELLA SUSCETTIBILITÀ AI BETA LATTAMICI IN CEPPI DI *C.COLI* E *C.JEJUNI* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC SUSCEPTIBILITY TO B-LACTAMS IN *C.COLI* AND *C.JEJUNI* ISOLATED FROM MEAT CHICKEN FARMS

Casagrande Proietti P., Bellucci S., De Luca S., Guelfi G., Pieramati C., Franciosini M.P.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Via San Costanzo 4, Perugia 06100

Summary

The study was carried out to determine phenotypically the susceptibility of 80 *Campylobacter* spp. (20 *C. jejuni* and 60 *C. coli*) strains to β -lactams and to assess the presence of the bla_{OXA-61} gene from both qualitative and quantitative point of view in relation to production of β -lactamase. Finally, the correlation between the expression of the bla_{OXA-61} gene and the action of sulbactam and clavulanic acid as inhibitors were also evaluated. All strains were investigated by disk diffusion test against the following antimicrobials (AMP), amoxicillin (AML), ticarcillin (TIC), cefalexin (CL), cefoxitin (FOX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), meropenem (MEM), imipenem (IMP), ampicillin + sub AMS), amoxicillin + clavulanic acid (AUG), ticarcillin + clavulanic acid (TIC). The antimicrobial susceptibility of ampicillin was determined by Ampicillin M.I.C. Evaluator Strips. Our work showed that almost of the *C. coli* and *C. jejuni* strains, both were resistant to AMP and AML. There were no statistically significant differences between the two species apart from the TIC resistance value, higher in *C. coli*. The strains investigated were highly susceptible to carbapenems. In our case, most all of the strains were nitrocefin positive and showed the bla_{OXA-61} gene by qRPCR. Poor efficacy of clavulanic acid and sulbactam as inhibitors was evidenced in both *C. coli* and *C. jejuni*, however the only effective association is TIC in *C. jejuni* supporting the hypothesis of a different antibiotic resistance mechanisms played in relation to the *Campylobacter* species.

INTRODUZIONE

E' noto da tempo come i *Campylobacter* termotolleranti isolati dall'uomo e dal pollame siano resistenti alla maggior parte di antimicrobici inclusi nella famiglia dei beta-lattamici, quali amoxicillina, ampicillina e ticarcillina (Lachance et al., 1991). Tale resistenza è messa in correlazione perlopiù con la presenza di β -lattamasi, presente nella quasi totalità di isolati di *C. jejuni* (83-92%) (Tajada et al., 1996). Il ruolo di questo enzima, comunque, nel determinismo dei fenomeni di resistenza appare spesso controverso. Fliegelman et al. (1985) hanno dimostrato che in alcuni casi la maggior parte di isolati di *C. jejuni* positivi al test nitrocefin per la presenza di β -lattamasi risultava sensibile all'azione dell'ampicillina facendo presupporre l'implicazione di meccanismi diversi nel determinismo della resistenza. Il gene responsabile della produzione di β -lattamasi, designato come bla_{OXA-61} (Alfredson et al., 2005) mostra identità con i geni bla_{OXA-61}

di *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Griggs et al.2009). Gli inibitori di β -lattamasi più conosciuti sono l'acido clavulanico, seguito dai composti sintetici sulbactam e tazobactam (Gaudreau et al., 1987). Obiettivi del presente lavoro sono stati quelli di determinare fenotipicamente la suscettibilità ai beta- lattamici di ceppi di *C.coli* e *C.jejuni* isolati in allevamento e di valutare la presenza del gene bla_{OXA-61} da un punto di vista qualitativo e quantitativo in relazione alla produzione di β -lattamasi. Infine è stata messa in evidenza la presenza di una eventuale correlazione tra l'espressione del gene bla_{OXA-61} e l'azione di sulbactam e acido clavulanico come inibitori.

MATERIALI E METODI

Determinazione fenotipica della suscettibilità agli antimicrobici beta-lattamici

Un totale di 80 ceppi di *Campylobacter spp.*, di cui 20 *C. jejuni* e 60 *C.coli* è stato sottoposto a test di suscettibilità agli antibiotici mediante il metodo di diffusione su piastra. I ceppi sono stati seminati su piastre di Mueller-Hinton sangue (5% di sangue defibrinato di montone) su cui sono stati applicati i dischetti contenenti i diversi antibiotici a determinate concentrazioni: amoxicillina (25 μ g) ticarcillina (75 μ g) cefalexina (30 μ g) cefoxitina (30 μ g) cefotaxime (30 μ g) ceftazidime (30 μ g) cefepime (30 μ g), meropenem (10 μ g), imipenem (10 μ g), ampicillina+subalctam (20 μ g), amoxicillina+acido clavulanico (30 μ g) ticarcillina+acido clavulanico (85 μ g). La suscettibilità all'ampicillina è stata valutata mediante E-test (Oxoid). I risultati concernenti ampicillina e cefotaxime sono stati valutati in accordo ai criteri interpretativi della Società francese di Microbiologia mentre per tutti gli altri sono stati utilizzati i breakpoints stabiliti dall'EUCAST per gli Enterobatteri poiché per *Campylobacter spp.* non sono disponibili breakpoints specifici in riferimento a tali antibiotici.

Determinazione fenotipica della suscettibilità all' ampicillina

La suscettibilità all'ampicillina è stata valutata mediante Ampicillin M.I.C.Evaluator Strips(Thermofisher Oxoid).

Determinazione dell'attività betalattamasica.

In tutti gli 80 ceppi è stata è stata valutata l'attività beta-lattamasica mediante il test del nitrocefina (Sigma-Aldrich, S.R.L, Milano)

Determinazione del gene bla_{OXA-61} e quantificazione dell'espressione genica.

Su tutti i campioni, previa estrazione del DNA genomico, è stata eseguita la PCR per la determinazione del gene bla_{OXA-61} (281 bp). I campioni risultati negativi alla PCR (11/80) e 28 ceppi di cui 14 *C. coli* e 14 *C. jejuni*, considerati rappresentativi del numero totale sono stati sottoposti alla estrazione dell'RNA genomico mediante il Kit Norgen RNA Purification (Norgen-Biotek, Corp, Roma.); l'RNA ottenuto è stato quindi retroscritto con i SCRIPT cDNA (Bio-rad Laboratori, Milano). Nei campioni è stata successivamente eseguita la qRT-PCR utilizzando i primers descritti in tabella 1.

Tabella 1- Primers utilizzati per qRT-PCR

Geni	Sequenze (5'-3')	Bp
Gyr-a	R: ATGCTCTTTGCAGTAACCAAAAAA F: CGACTTACACGGCCGATTTC	80
16S	R: AATCTTGCGACCGTACTCCC F: AGTCCACGCCCTAAACGATG	90
bla_{OXA-61}	R: CCAATTCCTTGGCCACTTC F: GAGTATAATACAAGCGGCAC	281
bla_{OXA-61}	R: AATCTTGCGACCGTACTCCC F: AGTCCACGCCCTAAACGATG	70

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test esatto di Fisher per valutare le differenze nella resistenza agli antimicrobici in *C. jejuni* e in *C. coli*. In particolare per valutare in *C.coli* l'associazione tra l'espressione del gene bla_{OXA-61} e l'efficacia dell'inibitore acido clavulanico con amoxicillina è stata applicata la regressione logistica binomiale; mentre per determinare l'associazione tra l'espressione del gene bla_{OXA-61} e l'efficacia dell'inibitore acido clavulanico con ticarcillina è stata applicata una regressione logistica a tre classi. Per valutare l'associazione tra l'espressione del gene bla_{OXA-61} e l'efficacia dell'inibitore sulbactam con ampicillina in *C.jejuni* è stata applicata una regressione logistica a tre classi.

RISULTATI

La totalità di ceppi di *C. coli* sono risultati resistenti all'ampicillina, mentre 18 isolati di *C. jejuni* su 20 sono risultati resistenti. Sia i ceppi di *C. coli* che quelli di *C. jejuni* hanno mostrato una prevalenza di resistenza elevata alle penicilline e alle cefalosporine di I, II e III generazione, con differenze significative solo per TIC (P< 0.01) mentre tutti sono risultati sensibili alle cefalosporine di IV generazione e ai carbapenemi. (Tab.2). Tutti gli isolati di *C.coli* si sono mostrati più resistenti alle associazioni TIM e AMS (P< 0.001) rispetto a *C.jejuni* (tab.2). Questi ultimi hanno mostrato una prevalenza di resistenza ad AUG superiore rispetto ai ceppi di *C. coli*. Al test del nitrocefina 1 ceppo su 80 è risultato negativo.

Tabella 2. Profilo di antibiotico- resistenza di *C. jejuni* e *C.coli* isolati

		AML	TIC	CL	FOX	CTX	CAZ	FEP	MEM	IMP	AMS	AUG	TIM
<i>C.jejuni</i>	R	20(100)	*14(70)	20(100)	20(100)	20(100)	6(30)	0(-)	0(-)	0(-)	**14(70)	18(90)	**1(5)
	I	0(-)	2(10)	0(-)	0(-)	0(-)	13(65)	1(5)	0(-)	0(-)	2(10)	0(-)	2(10)
	S	0(-)	4(20)	0(-)	0(-)	0(-)	1(5)	19(95)	20(100)	20(100)	4(20)	2(10)	17(85)
<i>C.coli</i>	R	60(100)	*58(96,7)	60(100)	60(100)	58(96,7)	24(40)	0(-)	0(-)	0(-)	**59(98,3)	40(66,7)	**52(86,7)
	I	0(-)	1(1,7)	0(-)	0(-)	2(3,3)	35(58,3)	1(1,7)	1(1,7)	0(-)	1(1,7)	8(13,3)	3(5)
	S	0(-)	1(1,7)	0(-)	0(-)	0(-)	1(1,7)	58(96,7)	58(96,7)	60(100)	0(-)	12(20)	5(8,3)

AML, amoxicillina; TIC, ticarcillina; CL,cefalexina; FOX, cefoxitina; CTX, cefotaxime; CAZ,ceftazidime; FEP,cefepime; MEM,meropenem, IMP; imipenem AMS, ampicillina + sulbactam; AUG, amoxicillina+ac clavulanico; TIM,ticarcillina+ ac.clavulanico. Differenza statisticamente significativa tra gli isolati di *C. coli* e *C. jejuni* * < 0.01 **P < 0.001

In riferimento alla presenza del gene bla_{OXA-61} gli 11 campioni negativi alla PCR sono risultati positivi se testati con qRT-PCR. In *C.coli* è risultata un'associazione statisticamente significativa tra l'espressione di bla_{OXA-61} e la resistenza alle associazioni AUG e TIM, mentre non è stato possibile applicare l'analisi statistica in caso di AMS in quanto i ceppi di *C.coli* sono risultati tutti resistenti e pertanto il campione risultava essere monofattoriale (Tab. 3). In *C.jejuni* si riscontra una associazione statisticamente significativa tra l'espressione di bla_{OXA-61} e la resistenza AMS, non presente invece per AUG. La presenza di un unico campione resistente a TIM non ha permesso di valutare la significatività di questo dato (Tab. 4)

Tabella 3 Associazione tra l'espressione genica di bla_{OXA-61} (ΔCt) e l'efficacia degli inibitori riscontrata nei 14 isolati di *C.coli*

AMP, ampicillina AMS, ampicillina + sulbactam; AUG, amoxicillina+ac clavulanico; TIM,ticarcillina+ ac.clavulanico.

N° isolati	AMP	AUG	AMS	TIM	ΔCt
1	R	R	R	R	13,20
2	R	R	R	R	13,47
3	R	R	R	R	13,79
4	R	R	R	R	9,18
5	R	R	R	R	13,61
6	R	R	R	R	13,29
7	R	R	R	R	11,96
8	R	R	R	R	15,40
9	R	S	R	S	16,10
10	R	S	R	S	16,70
11	R	S	R	I	16,60
12	R	S	R	S	18,20
13	R	S	R	I	19,08
14	R	S	R	S	16,33

Tabella 4 Associazione tra l'espressione genica di bla_{OXA-61} (ΔCt) e l'efficacia degli inibitori riscontrata nei 14 isolati di *C.jejuni*

AMP, ampicillina ; AMS, ampicillina + sulbactam; AUG, amoxicillina+ac clavulanico; TIM,ticarcillina+ ac.clavulanico

N° isolati	AMP	AUG	AMS	TIM	ΔCt
1	R	R	S	S	25,79
2	R	S	S	S	25,29
3	R	R	S	S	24,12
4	R	R	R	S	10,38
5	R	R	R	R	14,05
6	R	R	R	S	13,93
7	R	R	R	S	11,38
8	R	R	R	S	16,58
9	R	R	R	S	15,84
10	S	S	S	S	27,03
11	S	R	S	S	27,05
12	R	R	R	S	11,47
13	R	R	R	S	12,63
14	R	R	R	S	14,00

DISCUSSIONE

La resistenza ad ampicillina e ad altri beta lattamici è stata segnalata ormai da tempo sia nell'uomo che nei polli (Thwaites e Frost, 1999). Nel nostro lavoro la quasi totalità dei ceppi saggati, sia di *C.coli* che di *C.jejuni*, si è mostrata resistente ad ampicillina e amoxicillina che sono largamente utilizzate come terapia in campo avicolo. Non ci sono differenze statisticamente significative tra le 2 specie batteriche a parte i valori di resistenza, registrati per la ticarcillina, più alti in *C.coli*. Va sottolineato che tale resistenza è estesa anche alle cefalosporine di I,II, e III generazione in conformità ad altri lavori (Griggs et al., 2009, Giacomelli et al., 2012), sebbene queste non vengano impiegate nel pollame. La resistenza a questa classe di beta-lattamici è stata descritta anche in *Enterococcus* spp. (Van den Bogaard et al., 2002), in *Salmonella* spp. e in *E.coli* (Liebana et al., 2001; Dutil et al., 2010) provenienti dal pollame. Gli isolati saggati nel nostro studio mostrano invece una elevata sensibilità nei confronti dei carbapenemi, molecole ancora più recenti, in conformità con altri studi (Karikari et al, 2017), in cui è stata messa in evidenza una elevata suscettibilità (in alcuni casi fino al 100%) all'imipenem. La resistenza che *Campylobacter*, proveniente dall'uomo e dal pollame, mostra nei confronti dei beta-lattamici è stata messa in correlazione con l'enzima β -lattamasi sebbene il suo ruolo spesso appare controverso (Lachance et al., 1991). Nel nostro caso la quasi totalità dei ceppi è risultata positiva al test del nitrocefina e va specificato che tutti gli isolati saggati

con qPCR sono risultati possedere il bla_{OXA-61} , responsabile della sintesi di β -lattamasi di classe D, sebbene espresso in differenti quantità. Per *C.coli* l'acido clavulanico, in associazione con amoxicillina e ticarcillina, ha scarsa azione inibente in quanto si ha un aumento di sensibilità rispettivamente del 20% e del 6, 6% mentre la prevalenza di resistenza ad amoxicillina e sulbactam è stata del 98,3%. Tali risultati sono in accordo con Bush and Jacoby (2010) che affermano che alla classe D di Ambler appartengono oxacillinasi scarsamente inibite dall'acido clavulanico mentre sono in disaccordo con lo studio di Griggs et al., (2009) il quale afferma che l'acido clavulanico in associazione con amoxicillina svolge in modo efficace la sua azione di inibitore. In *C.coli* è risultata un'associazione statisticamente significativa tra l'espressione di bla_{OXA-61} e la resistenza ad amoxicillina+ acido clavulanico e a ticarcillina + acido clavulanico. Sembra dunque che l'acido clavulanico svolga la sua azione di inibitore in relazione all'espressione genica. Minore è l'espressione genica e di conseguenza minore è la quantità di β -lattamasi prodotta e maggiore è l'azione inibitrice esercitata dall'acido clavulanico. Per *C.jejuni*, il sulbactam in associazione con l'ampicillina ha portato ad un aumento della sensibilità del 10% dimostrando una scarsa azione inibente. E' stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra l'espressione di bla_{OXA61} e la resistenza ad ampicillina più sulbactam dimostrando che anche quest'ultimo ha una azione inibitrice in relazione all'espressione genica. Per *C.jejuni* è risultata una prevalenza di resistenza all'amoxicillina associata all'acido clavulanico pari al 90% e non esiste correlazione tra l'espressione genica di bla_{OXA-61} e l'efficacia dell'inibitore, supportando l'ipotesi che la resistenza osservata possa essere attribuita anche ad ulteriori meccanismi genetici. Va riportato a tal proposito l'identificazione da parte di Griggs et al. (2009) di un altro gene CjBla2 presente in *C.jejuni* in grado di esprimere una diversa β -lattamasi, responsabile di una aumentata suscettibilità ai penemi e ai meropenemi. E' da sottolineare che in unione con la ticarcillina l'acido clavulanico svolge efficacemente il ruolo di inibitore portando ad una diminuzione della resistenza del 65%, con l'85% dei ceppi sensibili in accordo con Griggs et al., (2009).

CONCLUSIONI

I risultati del presente lavoro hanno dimostrato una scarsa efficacia di acido clavulanico e sulbactam nelle 2 specie batteriche, sebbene la prevalenza di resistenza è significativamente più alta in *C.coli*. L'unica associazione che si è dimostrata vantaggiosa è stata quella rappresentata da acido clavulanico e ticarcillina, riferita solo a *C.jejuni*. In una nostra precedente ricerca già avevamo riscontrato una resistenza del 30% all'eritromicina riferita a 99 ceppi di *C.coli* non osservata in *C.jejuni* (Pergola et al., 2017) a testimonianza verosimilmente di una diversa suscettibilità legata alla specie. Tale ipotesi appare supportata dalla evidenziazione di una regione fortemente ipervariabile in *C.jejuni*, non presente in *C.coli* che ne può modificare il comportamento (Stahl et al., 2012, Vidal et al., 2016). E' da sottolineare infine come nel presente lavoro i risultati riferiti all'associazione di amoxicillina e acido clavulanico, impiegata in medicina umana nei casi in cui *Campylobacter* risulta resistente a fluorochinoloni ed eritromicina, non siano particolarmente confortanti in tal senso.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfredson D and V Korolik. (2005). Isolation and expression of a novel molecular class D β -lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2515–2518.
2. Bush K and G.A Jacoby. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 969–976.
3. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, Bourgault AM, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Demczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, D.R Pillai. (2010). Ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* 16:48–54.
4. Fliegelman RM, Petrak RM, Goodman LJ, Segreti J, Trenholme GM, R.L Kaplan. (1985). Comparative *in vitro* activities of twelve antimicrobial agents against *Campylobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 27:429–430.
5. Gaudreau, C. L., L. A. Lariviere, J. C. Lauzer, F. F. Turgeon. (1987). Effect of clavulanic acid on susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to eight β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:940–942.
6. Giacomelli, M., Andrighetto, C., Rossi, F., Lombardi, A., Rizzotti, L., Martini, M., A. Piccirillo. (2012). Molecular characterization and genotypic antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler flocks in northern Italy. *Avian Pathol* 41: 579–588.
7. Griggs D. J., Peake L., Johnson M., Ghori S., Mott A, J. V. Piddock. (2009). Lactamase-Mediated β -Lactam Resistance in *Campylobacter* Species: Prevalence of Cj0299 (bla_{OXA-61}) and Evidence for a Novel β -Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3357–3364
8. Karikari AB, Obiri-Danso K, Frimpong EH, KA Krogfelt. (2017). Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Recovered from Faeces and Carcasses of Healthy Livestock. *Biomed Res Int.* 1-9
9. Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F, LA Lariviere (1991) Role of the β -lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to β -lactam agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 813–818
10. Liebana E, Guns D, Garcia-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley FA, RH Davies. (2001). Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol* 39: 3609–3616.
11. Pergola S, Franciosini MP, Comitini F, Ciani M, De Luca S, Bellucci S, Menchetti L, P Casagrande Proietti. (2017). Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. *J Appl Microbiol.* 122: 1348–1356

12. Stahl M, Butcher J, A Stintzi . (2012). Nutrient Acquisition and Metabolism by *Campylobacter jejuni*”, Front Cell Infect Microbiol. 2: 5.
13. Tajada P, Gomez-Garces JL., Alòs JI., Balas D, R Cogollos .(1996).Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 β -lactam agents and combinations with β -lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 40:1924–1925.
14. Thwaites RT and JA Frost. (1999). Drug resistance in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolated from humans in north west England and Wales, 1997. J. Clin. Pathol. 52:812-814.
15. van den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, EE Stobberingh (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J Antimicrob Chemother. 49: 497–505.
16. Vidal AB, Colles FM, Rodgers JD, McCarthy ND, Davies RH, Maiden MC, FA Clifton-Hadley .(2016). Genetic Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from conventional broiler flocks and the impacts of sampling strategy and laboratory method. Appl Environ Microbiol. 82 :2347-2355.

MYCOPLASMA SYNOVIAE: UN OTTIMO ESEMPIO DI PATOGENO ADATTABILE ALLE CONDIZIONI DELL’OSPITE. CASO CLINICO

Catania S., Mainenti M., Zanardello C., Picchi M., Matucci A., Gobbo F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell’Università 10, 35020 Legnaro (PD) Italy, e-mail: scatania@izsvenezie.it

SUMMARY

Mycoplasma synoviae (MS) is considered an important pathogen in poultry causing severe economic losses in any type of commercial operation. Particularly in layer hens, lesions such as egg shell abnormalities have caught major attention in the recent years, but also decrease in egg production, egg weight, an amyloid arthropathy in association with *Enterococcus spp.* have been described. This work aims to share a case of MS infection in commercial pullets with an atypical clinical manifestation. Particularly, only 1 house was severely affected by walking difficulties with 80% morbidity, whereas in the other 2 houses scarce clinical signs were present despite the same MS strain was circulating. Full necropsies and laboratory analyses were performed in order to find a possible explanation to such difference. The same strain of MS was recovered by PCR from tracheal swabs in all houses. Interestingly, only the animals belonging to the house severely affected showed MS PCR positivity also in all the joints collected, and no other synergic bacterial or viral agents were retrieved. Moreover, only in these animals a marked decrease in size of the thymus with severe lymphoid depletion was also present, whereas no macroscopic or histologic lesions to this organ were found in the animals from other houses. These data suggest that a difference in the immunitary system may have played a role in the atypical spread of the disease and severity of clinical findings only in one house, especially if we consider that MS usually behaves as an opportunistic pathogen. This underlines that specific host conditions should always be considered when atypical findings involving common pathogen, especially those of “opportunistic microorganism”, are found.

INTRODUZIONE

Mycoplasma synoviae (MS) è una delle specie di micoplasmi considerate rilevanti per il comparto avicolo industriale, poiché la sua presenza può contribuire a determinare importanti ripercussioni in termini produttivi. Nel settore della gallina ovaioia, negli ultimi anni tale microrganismo è stato oggetto di particolare attenzione a causa delle anomalie del guscio ad esso correlate (Catania *et al.*, 2010, 2016; Feberwee *et al.*, 2009). Recentemente, Catania e collaboratori (2016) hanno dimostrato, mediante infezione sperimentale, che non tutti i ceppi di MS possono produrre le tipiche lesioni apicali del guscio e che, anche in assenza di lesioni apicali, l’infezione da MS determina una diminuzione del numero delle uova deposte e del loro peso medio, concludendo quindi che l’impatto di MS in tale settore non deve essere solamente correlato alle caratteristiche anomalie. Sempre nella gallina ovaioia ed in particolare nella fase pollastra, una forma di artrite, definita amiloide, è stata riportata in nord Europa in cui *Enterococcus fecalis* e *Mycoplasma synoviae* erano considerati attori o co-attori della lesione

(Landmann & Feberwee, 2001). E' opportuno precisare che tali lesioni sono state evidenziate anche nel territorio italiano e sulla base della nostra esperienza risultano principalmente correlate ad una infezione da enterococco, dato che i metodi diagnostici in nostro possesso non hanno evidenziato la presenza di MS. Basandoci sia su infezioni sperimentali, sia sull'esperienza di campo possiamo immaginare che la copresenza dei due patogeni possa determinare un aggravamento della situazione clinica, visto che in particolare il *Mycoplasma synoviae* manifesta il suo potere patogeno in maniera più evidente se in coinfezione (Feberwee *et al.*, 2009; Moronato *et al.*, 2016).

Scopo del presente lavoro è quello di condividere un recente caso clinico in un allevamento di pollastre risultato positivo a MS, dove si è potuta notare un'importante manifestazione clinica con conseguente impatto zootecnico e notevoli perdite economiche solamente in un capannone, mentre nei due rimanenti, seppur in presenza del *Mycoplasma synoviae*, le manifestazioni cliniche sono state poco evidenti o addirittura trascurabili, così come le perdite economiche ad esso correlate. Quindi, al fine di verificare o almeno cercare di chiarire il motivo di tali differenze in termini di risposta clinica/produttiva tra i tre capannoni oggetto di studio, si è deciso di applicare accertamenti diagnostici addizionali.

Caso clinico

In un allevamento di pollastre della capacità di circa 54 000 animali (suddivisi in tre capannoni contigui 1-2-3), è stata rilevata riluttanza al movimento e conseguente calo dell'assunzione di alimento a partire dalla dodicesima settimana di vita nel solo capannone 1, nello specifico 2 settimane dopo la presa per vaccinazione. In un primo momento il calo dell'assunzione è stato imputato all'alimento, visto che solo tale capannone era alimentato con mangime biologico rispetto agli altri due (capannone 2 e 3) in cui si utilizzava mangime convenzionale.

Su tale ipotesi il mangime è stato prontamente sostituito, anche se occorre segnalare che tale misura di controllo non ha apportato particolari miglioramenti, anzi la problematica è andata progressivamente peggiorando fino ad evidenziare la presenza di tumefazioni bilaterali delle articolazioni degli arti inferiori e superiori, associata ad un evidente abbassamento delle ali. Gli animali manifestavano tutti i segni tipici di una malattia a diffusione sistemica con malessere generale, piumaggio scomposto e sonnolenza. L'incidenza ha raggiunto circa l'80% dei soggetti, in assenza di mortalità, gli animali risultavano notevolmente sottopeso e quindi non utilizzabili a fini commerciali.

Viste le lesioni articolari rilevate è stato deciso solamente nel capannone 1 di effettuare specifici esami sui liquidi articolari tra cui batteriologici oltre alla ricerca specifica di MS mediante PCR che è risultata essere positiva. Si è proceduto quindi ad un trattamento antibiotico seppur con scarsi risultati dal punto di vista clinico. I rimanenti due capannoni (capannone 2 e 3) non hanno mostrato, neanche nelle settimane successive, un quadro clinico riferibile a quello mostrato dal capannone colpito, ad eccezione per un esiguo numero di animali (circa un centinaio) che presentavano sintomatologia comparabile al primo e quindi con un'incidenza notevolmente inferiore a quella del capannone 1. Le differenze gestionali tra il capannone 1 ed i capannoni 2 e 3 rilevate in anamnesi sono state, oltre la differenza alimentazione (mangime biologico e convenzionale), la presa vaccinale sia in

termini temporali che di personale, inoltre solo gli animali del capannone 1 hanno ricevuto in aggiunta anche il vaccino per *Salmonella gallinarum* ceppo 9R.

In conclusione in termini produttivi, dal capannone 1 non è stato possibile produrre pollastre vendibili, mentre nel capannone 2 e 3 i livelli di produzione sono stati comunque in linea con gli *standard*.

Sulla base di tali dati siamo stati interpellati per cercare di capire cosa poteva essere accaduto vista la notevole differenza tra capannone 1 e capannone 2-3.

MATERIALI E METODI

Almeno 5 carcasse e 10 campioni di sangue sono stati di prelevati da tutti e tre i capannoni al fine di verificare la presenza del *Mycoplasma synoviae* nei differenti capannoni, com'era presumibile che fosse, e cercare di capire quale possibile altro cofattore (IBV, APV, Reovirus ecc.) potesse aver determinato un simile potenziamento dell'attività patogena del *Mycoplasma synoviae* solamente in un capannone. Inoltre il protocollo necroscopico applicato ha visto l'inserimento di alcuni accorgimenti addizionali, frutto dello studio preventivo del caso, rispetto al protocollo necroscopico diagnostico classico in particolare si è cercato di evitare l'approccio in *pool*, effettuando le analisi per singolo campione di organo o soggetto. Nello specifico, l'isolamento e la PCR per MS sono stati effettuati da diverse e specifiche articolazioni al fine di verificare l'eventuale presenza del micoplasma nei differenti distretti articolari, oltre ad isolamento batteriologico classico e metodiche specifiche per la ricerca di *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Infine l'isolamento per salmonelle è stato effettuato da differenti matrici comprese le articolazioni a causa del rilevamento in anamnesi della differenziazione del piano vaccinale nei soli soggetti del capannone 1. Inoltre campioni di milza, trachea, polmone e cervello sono stati sottoposti ad isolamento batterico.

Inoltre è stata posta particolare attenzione al rilievo di alterazioni macroscopiche ed in seguito istologiche (E-E) delle articolazioni degli animali dei tre differenti gruppi e di organi linfoidi quali timo, milza e borsa di Fabrizio, in quanto avevamo supposto che *défaillance* immunitarie importanti potessero aver determinato una massiva diffusione del patogeno. Inoltre, in sede autoptica si sono collezionate diverse matrici biologiche per inclusione/esclusione di forme virali concomitanti: nello specifico si è eseguita dalla matrice rene una rt-PCR real time per il virus della Bronchite infettiva e dalla matrice articolare l'isolamento di Reovirus in colture cellulari.

RISULTATI

I tre gruppi hanno mostrato positività sia in PCR che in isolamento per *Mycoplasma synoviae* da tamponi tracheali, mentre tutte le articolazioni campionate sono risultate positive solamente nei soggetti del capannone 1. Il ceppo di MS coinvolto è risultato essere il medesimo tra i tre capannoni analizzati. Dal punto di vista anatomopatologico, nel capannone 1 l'interessamento delle articolazioni era particolarmente evidente con coinvolgimento delle articolazioni degli arti superiori e della borsa sternale, in presenza di distensione della capsula articolare con contenuto liquido chiaro-filante. Solamente in due soggetti è stato possibile rilevare iniziali segni di cronicizzazione, inoltre sono stati evidenziati segni di reattività splenica, infine il timo si presentava notevolmente diminuito di volume. Sia nel

capannone 2 che nel 3 non sono state rilevate lesioni macroscopiche evidenti a carico delle articolazioni, gli animali si presentavano normo conformati senza alcuna particolare lesione ad eccezione della presenza di essudazione catarrale a carico delle alte vie aeree.

Dal punto di vista batteriologico tra gli organi campionati sono risultati positivi una sola trachea del capannone 1 in cui è stato rilevato l'ORT, 3 trachee e 3 polmoni del capannone 2 e 3, con presenza di *Escherichia coli* e *Gallibacterium anatis*, mentre i restanti organi sono risultati negativi. La ricerca specifica di *Salmonella* è risultata negativa in tutti i campioni testati dei tre capannoni. Dal punto di vista virologico solamente nel capannone 2 è stata rilevata la positività in RT-PCR per Bronchite Infettiva da rene ed il sequenziamento ha dato un'omologia di sequenza del 100% con il ceppo 793/B. L'isolamento per Reovirus da campioni articolari ha dato esito negativo in tutti i capannoni.

Istologicamente a carico delle articolazioni dei soli soggetti del capannone 1 è stato possibile rilevare artrosinovite fibrino-eterofila in fase di cronicizzazione con aspetti villosi. Inoltre, a carico dei tendini è stato possibile rilevare importante edema con infiltrazione di eterofili e plasmacellule, con neovascolarizzazione dell'area circostante. Sempre nel capannone 1, a carico del timo si è osservata una attenuata demarcazione tra corticale e midollare associata ad una marcata riduzione della popolazione linfoide, compatibile con un quadro di atrofia timica.

Istologicamente non si sono rilevate alterazioni a carico delle articolazioni esaminate nei capannoni 2 e 3.

CONCLUSIONI

Sulla base dei dati laboratoristici ottenuti, è stato possibile confermare il sospetto di prima istanza, in cui MS veniva considerato come l'agente patogeno responsabile delle problematiche rilevate. Dagli approfondimenti diagnostici è stato possibile classificare il ceppo di MS come il medesimo nei tre capannoni, quindi la valutazione aggiuntiva effettuata è risultata utile a svelare o almeno avanzare o confutare varie ipotesi.

In primis non sono stati rilevati altri agenti patogeni che possano aver agito in modo sinergico determinando una diffusione articolare di MS particolarmente grave e con elevata incidenza solamente in un capannone, differendo notevolmente anche dalle consuete condizioni di campo. Anche se è opportuno evidenziare che dal punto di vista istologico le lesioni rilevate nelle articolazioni dei soggetti del capannone 1 non risultano essere tipiche di una infezione da micoplasmi, ma bensì ad una più generica infezione batterica. Sulla base di tali evidenze ed in funzione della grave atrofia timica rilevata è quindi possibile ipotizzare che il gruppo del capannone 1, per un motivo che allo stato attuale non è possibile dimostrare, avesse una immunodeficienza, presumibilmente delle cellule T, plasticamente manifesta con ipotrofia timica visibile macroscopicamente e confermata istologicamente. Infatti su tale ipotesi è possibile speculare che la scarsa o scomposta reazione immunitaria potrebbe aver contribuito alla diffusione di MS nei vari distretti articolari, comportando una grave tenosinovite diffusa solo nel capannone 1. Al contrario, negli altri due capannoni (risposta immunitaria fisiologica) sottoposti al medesimo *challenge* di campo (medesimo ceppo di MS) si è avuto il comportamento di una normale infezione da MS con positività del gruppo (PCR ed isolamento positivo e

sieroconversione) e pochissimi soggetti con problemi alle articolazioni, per lo più a livello tibiotarsico.

Tale caso risulta particolarmente interessante in quanto dimostra plasticamente come l'impatto patologico di un germe ed in particolare di MS, da sempre considerato un patogeno opportunista almeno del settore della ovaia non dipenda solamente dal microorganismo stesso, ma anche e soprattutto dalle condizioni dell'ospite. E' quindi presumibile che una differente scala di grigi possa rappresentare, nel nostro immaginario, l'impatto patologico dell'MS, rivedendo e rivalutando di conseguenza "l'effetto ceppo" che, almeno ad oggi, non è sembrato particolarmente importante se non per determinati e specifici casi come le lesioni apicali del guscio.

Quindi condizioni specifiche dell'ospite dovrebbero essere considerate e valutate attentamente per una corretta interpretazione sia dei dati laboratoristici che delle evidenze cliniche, soprattutto per quadri che si discostano in maniera più o meno netta da quello considerato "normale e/o tipico". Tale approccio dovrebbe essere tenuto ancora più a mente per quei microrganismi "opportunisti" corresponsabili di malattia ad eziologia complessa.

BIBLIOGRAFIA

Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.* 2010 Jun;54(2):961-4.

Catania S, Gobbo F, Bilato D, Gagliazzo L, Moronato ML, Terregino C, Bradbury JM, Ramírez AS. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Vet Microbiol.* 2016 Sep 25;193:60-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.007. Epub 2016 Aug 11.

Ferberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 2009 Feb;38(1):77-85. doi: 10.1080/03079450802662772.

Landman WJ, Feberwee A. Field studies on the association between amyloid arthropathy and *Mycoplasma synoviae* infection, and experimental reproduction of the condition in brown layers. *Avian Pathol.* 2001 Dec;30(6):629-39. doi: 10.1080/03079450120092125.

Moronato ML, Gobbo F, Mainenti M, Franzo G, Cecchinato M, Catelli E, Catania S, Martini M. Infezione sperimentale con *Metapneumovirus aviariae* e *Mycoplasma synoviae* in polli da carne: risultati preliminari. I° Simposio Scientifico SIPA, Parma 23 settembre 2016

PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER COLI* IN VOLATILI PET

Dipineto L., Borrelli L., D'Orazio S., Romano V., Varriale L., Russo T.P., Pace A., Fioretti A., Menna L.F.

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, via della Veterinaria 1, 80137

Summary

Several avian species are considered the main reservoirs of *Campylobacter* spp. Nevertheless, current scientific knowledge on the presence of *Campylobacter* spp. in pet birds is scarce. To address this lack of information, the present study was undertaken with the aim to evaluate the presence of these microorganisms in pet birds bred in southern Italy. To achieve this goal, 14 bird farms located in the Campania region (southern Italy) were visited. In each farm, bird farm population ranged between 20 to 100 animals belonging to the families of Estrildidae, Fringillidae and Psittacidae, from which 33, 28, and 27 pooled faecal samples were collected respectively. Specifically, eighty-eight cages housing a total of 225 captive birds were examined. The cage was used as an epidemiological unit, and each cage housed from 1 to 5 birds. Each sample was analyzed by cultural and molecular methods. A total of 12/88 (13.6%) cages were positive for *Campylobacter* spp. which was identified as *C. coli*. In particular, 7/33 (21.2%) cages came from Estrildidae and 5/27 (18.5%) cages came from Psittacidae family. The twenty-eight cages coming from Fringillidae family were consistently negative. Our results demonstrate that *C. coli* may be found in the intestines of apparently healthy pet birds which could be considered as a further potential carrier of *C. coli* for humans and other companion animals. The adoption of good hygiene practices when handling pet birds should be, therefore, promoted.

INTRODUZIONE

Nei paesi industrializzati, *Campylobacter jejuni* e *C. coli* rappresentano i principale agenti batterici responsabili di infezioni enteriche nell'uomo. Questi microrganismi colonizzano la mucosa intestinale della maggior parte degli animali a sangue caldo, inclusi gli animali da reddito e l'uomo [1]. I volatili rappresentano il principale reservoir [2, 3]. Tuttavia, i dati attuali sulla presenza di *Campylobacter* spp. negli uccelli tenuti come *pet* è frammentaria. Per approfondire queste informazioni, la presente indagine è stata condotta con lo scopo di valutare la prevalenza di *Campylobacter* spp. in volatili tenuti come *pet* nella regione Campania.

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'indagine è stata condotta, da Luglio a Dicembre 2015, in 14 allevamenti di uccelli appartenenti a differenti specie. Gli allevamenti erano ubicati in regione Campania e il campionamento è stato eseguito a seguito del consenso degli allevatori. La popolazione di volatili oscillava da 20 a 100 uccelli per ciascun allevamento. La



gabbia è stata utilizzata come unità epidemiologica e ogni gabbia ospitava da 1 a 5 uccelli. È stato esaminato un totale di 88 gabbie dal fondo di ciascuna delle quali venivano raccolti campioni di pool di feci, previa apposizione di un foglio di alluminio sterile. Nello specifico, sono state campionate 33 gabbie contenenti 118 volatili appartenenti alla famiglia Estrildidae, 28 gabbie ospitanti 64 uccelli appartenenti alla famiglia Fringillidae e 27 gabbie contenenti 43 uccelli appartenenti alla famiglia Psittacidae (Tabella 1). Tutti i volatili si presentavano in buone condizioni di salute e non avevano ricevuto alcun trattamento antibiotico durante il periodo di indagine.

Isolamento e identificazione

Ciascun campione di feci veniva conservato in *Amies Charcoal Transport Medium* (Oxoid, Basingstoke, UK) a +4°C, trasportato al laboratorio ed analizzato entro 2 ore dalla raccolta. I campioni venivano inoculati in *Bolton selective enrichment broth* (Oxoid) ed incubati in microaerofilia a 42°C per 48 ore. Si procedeva con l'isolamento e l'identificazione molecolare di specie mediante le tecniche descritte da Dipineto et al. [4].

Antibiogramma

Per tutti gli isolati veniva effettuato un antibiogramma utilizzando il metodo per diffusione (Test di Kirby - Bauer) sfruttando i breakpoint suggeriti da Siré et al. [5]. Poiché per *Campylobacter* spp. non sono disponibili breakpoint per tutti gli antibiotici, venivano testati solo quelli per ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), e tetraciclina (30 µg).

RISULTATI

I nostri risultati hanno mostrato una positività a *Campylobacter* spp. di 20/88 (13,6%; 95% intervallo di confidenza (IC) 7,6–23,0%) gabbie esaminate che in tutti i casi veniva identificato come *C. coli*. Nello specifico, 7/33 (21,2%; 95% IC 9,6–39,4%) gabbie ospitanti uccelli della famiglia Estrildidae e 5/27 (18,5%; 95% IC 7,0–38,8%) gabbie ospitanti uccelli della famiglia Psittacidae erano infette da *C. coli*. Di contro, tutte le gabbie (n = 28) contenenti uccelli della famiglia Fringillidae erano costantemente negative (Tabella 1). A livello di allevamento, la positività a *C. coli* è stata di 5/14 (35,7%; 95% IC 14,0–64,4%) allevamenti esaminati. Tutti i *C. coli* isolati erano sensibili all'eritromicina ma resistenti alla tetraciclina e ciprofloxacina.

DISCUSSIONE

I dati disponibili in letteratura sulla prevalenza di *Campylobacter* spp. negli uccelli pet sono scarsi eccetto quelli di uno studio condotto in Argentina [6] che riporta una prevalenza del 19,0%. Nel nostro studio, il 13,6% delle gabbie esaminate era positivo a *C. coli* e la maggior parte dei campioni positivi apparteneva alla specie *Taeniopygia guttata* (7/7) seguita da *Amazona* spp. (3/6) e *Agapornis* spp. (2/10).

Il presente studio suggerisce che *C. coli* può essere eliminato con le feci di volatili pet apparentemente sani che potrebbero, quindi, rappresentare un potenziale carrier di tale microrganismo per l'uomo. Inoltre, andrebbe considerato il potenziale rischio di trasmissione di batteri antibiotico-resistenti tra volatili, altre specie animali e l'uomo nonché promossa l'adozione di buone pratiche igienico-sanitarie durante la manipolazione di tali volatili.

BIBLIOGRAFIA

1. Newell DG, Fearnley C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4343–4351.
2. Dipineto L, Gargiulo A, De Luca Bossa LM, Rinaldi L, Borrelli L, Menna LF, Fioretti A. (2008). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in pheasants (*Phasianus colchicus*). *Avian Pathol.* 37:507–508.
3. Dipineto L, Gargiulo A, De Luca Bossa LM, Rinaldi L, Borrelli L, Santaniello A, et al. (2009). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in partridges (*Perdix perdix*). *Lett. Appl. Microbiol.* 49:351–353.
4. Dipineto L, De Luca Bossa LM, Russo TP, Cutino EA, Gargiulo A, Ciccarelli F, Raia P, Menna LF, Fioretti A. (2014). *Campylobacter* spp. and birds of prey. *Avian Dis.* 58:303-305.
5. Sifré E, Salha BA, Ducournau A, Floch P, Chardon H, Mégraud F, Lehours P. (2015). EUCAST recommendations for antimicrobial susceptibility testing applied to the three main *Campylobacter* species isolated in humans. *J. Microbiol. Methods.* 119:206–213.
6. López CM, Giacoboni G, Agostini A, Cornero FJ, Tellechea DM, Trinidad JJ. (2002). Thermotolerant *Campylobacter* in domestic animals in a defined population in Buenos Aires, Argentina. *Prev. Vet. Med.* 55:193–200.

Tabella 1. Famiglia e specie di uccelli testati, relativa popolazione e numero di gabbie testate con la percentuale di gabbie positive per *C. coli*

Famiglia	Uccelli testati	Popolazione volatili/n. gabbie testate	N. di positivi/campioni fecali testati (%)
Estrildidae	<i>Erythrura gouldiae</i>	67/22	0/22 (0%)
	<i>Lonchura striata domestica</i>	16/4	0/4 (0%)
	<i>Taeniopygia guttata</i>	35/7	7/7 (100%)
Fringillidae	<i>Carduelis carduelis</i>	18/9	0/9 (0%)
	<i>Serinus canaria</i>	46/19	0/19 (0%)
Psittacidae	<i>Agapornis</i> spp.	20/10	2/10 (20%)
	<i>Amazona</i> spp.	6/6	3/6 (50%)
	<i>Arinae</i> subfamily	6/3	0/3 (0%)
	<i>Cacatuidae</i> family	2/2	0/2 (0%)
	<i>Loriinae</i> subfamily	2/1	0/1 (0%)
	<i>Melopsittacus undulatus</i>	2/1	0/1 (0%)
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	2/1	0/1 (0%)
	<i>Psittacus erithacus</i>	3/3	0/3 (0%)
Total		225/88	12/88 (13.6%)

Popolazione volatili si riferisce al numero totale di uccelli ospitati nel numero totale di gabbie esaminate

CRITICITÀ DELLA DIAGNOSI MOLECOLARE PER LA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

Fortin A.¹, Cecchettin K.¹, Drago A.¹, Leardini S.¹, Marciano S.¹ e Terregino C.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is the causative agent of a highly contagious disease that results in severe economic losses to the global poultry industry. By reason of this economic importance it is crucial to use effective diagnostic methods. IBV exists in a wide variety of genetically distinct viral types, which increases the importance of choosing appropriate molecular methods for diagnostic use. In addition to genetics issues, there are other factors that influence diagnostic results, such as the characteristics of the virus, the use of live vaccines, the presence in the sample of multiple viral strains of different origin and characteristics, sample quality and different sensitivity and specificity of the available diagnostic methods. In this paper we face the most relevant laboratory problems, and we provide some suggestions for a correct diagnostic approach.

INTRODUZIONE

La Bronchite Infettiva aviaria (IB) è una malattia virale diffusa in tutto il mondo, secondaria come impatto economico per l'industria avicola solamente all'influenza aviaria. È caratterizzata da alta morbilità e capacità di trasmettersi rapidamente tra allevamenti diversi.

Il virus della Bronchite Infettiva è un coronavirus e, come tutti i virus a RNA, presenta un alto grado di diversità genetica che deriva da un'alta frequenza di mutazioni e ricombinazioni che danno vita a differenti genotipi virali con caratteristiche patogenetiche e biologiche differenti.

Il genoma dei coronavirus è il più grande genoma non-segmentato tra i virus a RNA attualmente conosciuti ed è costituito da un singolo filamento di RNA lineare, approssimativamente di 27.5-28 Kbp di lunghezza, a polarità positiva (ssRNA+) che, combinandosi con il capsid, forma un nucleocapsid a simmetria elicoidale. Il genoma è suddivisibile in *open reading frame* (ORF) che hanno il compito di codificare un complesso di proteine strutturali (per esempio S, E, M, N) e non-strutturali (per esempio NSPs 2-16, 3a, 3b, 5a, 5b). La glicoproteina S è costituita da una serie ordinata di due subunità: l'estremità N-terminale (S1 di 520 amminoacidi) che svolge una funzione di legame al recettore cellulare e l'estremità C-terminale (S2 di 625 amminoacidi) che permette la fusione con la membrana e il rilascio del virus nel citoplasma.

Come prevedibile, in funzione del suo ruolo biologico e della posizione nella struttura virale, questa proteina rappresenta anche il principale target della risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata. Rappresenta infatti il principale epitopo immunostimolante e neutralizzante. Questa alta pressione selettiva giustifica l'estrema variabilità della proteina S. Per classificare il virus della Bronchite Infettiva sono stati proposti vari metodi: i più comuni prendono in considerazione il sierotipo e il genotipo.

- *Classificazione in sierotipi*: tradizionalmente i sierotipi sono stati identificati per mezzo test di neutralizzazione su uova embrionate di pollo o di inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

- *Classificazione in genotipi*: per la classificazione si utilizza la tecnica della *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) al fine di amplificare il gene S o una parte di essa, che viene successivamente sequenziata.

Questo lavoro si propone di fornire una sintesi delle criticità della diagnostica molecolare per l'IB e fornire alcuni suggerimenti per un corretto approccio diagnostico.

PROBLEMATICHE NELLA INDIVIDUAZIONE DEL GENOMA VIRALE

La soluzione maggiormente utilizzata per individuazione generica del virus della IB è l'uso di una metodica di real time RT-PCR (rRT-PCR) grazie alla sua rapidità e sensibilità, che permette di ottenere un esito veloce e risultati robusti, tuttavia la scelta del target da rilevare è cruciale. Questa scelta dipende dall'obiettivo che si vuole raggiungere:

Un target conservato consente la generica identificazione del patogeno e spesso prevede utilizzo di target di dimensioni limitate che diminuiscono anche il numero di falsi negativi legati a problemi di degradazione (*drawbacks*). Questi tipi di positività sono però spesso dei fondi ciechi perché alla diagnosi generica non si accompagna la capacità di genotipizzare.

Un target variabile (S1), invece, consente una rapida identificazione del ceppo ricercato ma spesso si traduce in una riduzione della sensibilità del metodo. Infatti si selezioneranno solo alcune varianti genetiche tralasciandone altre che potrebbero essere presenti ma geneticamente diverse e quindi difficilmente identificabili da un metodo di questo tipo.

Un'altra problematica da considerare sono i frequenti eventi di ricombinazione del virus della bronchite aviaria, che portano a modifiche nella zona di appaiamento dei primers, cosa che potrebbe rendere le metodiche PCR genotipo specifiche meno sensibili o addirittura inefficaci.

PROBLEMATICHE NELLA GENOTIPIZZAZIONE

Prendendo in esame le diverse fasi si possono identificare due punti critici:

- 1) La RT-PCR di amplificazione;
- 2) L'interpretazione della sequenza generata.

RT-PCR di amplificazione

L'alta variabilità del gene S comporta una difficoltà nell'identificazione di zone conservate tra i diversi genotipi adatte al disegno di primers universali per la reazione di amplificazione (fig.1).

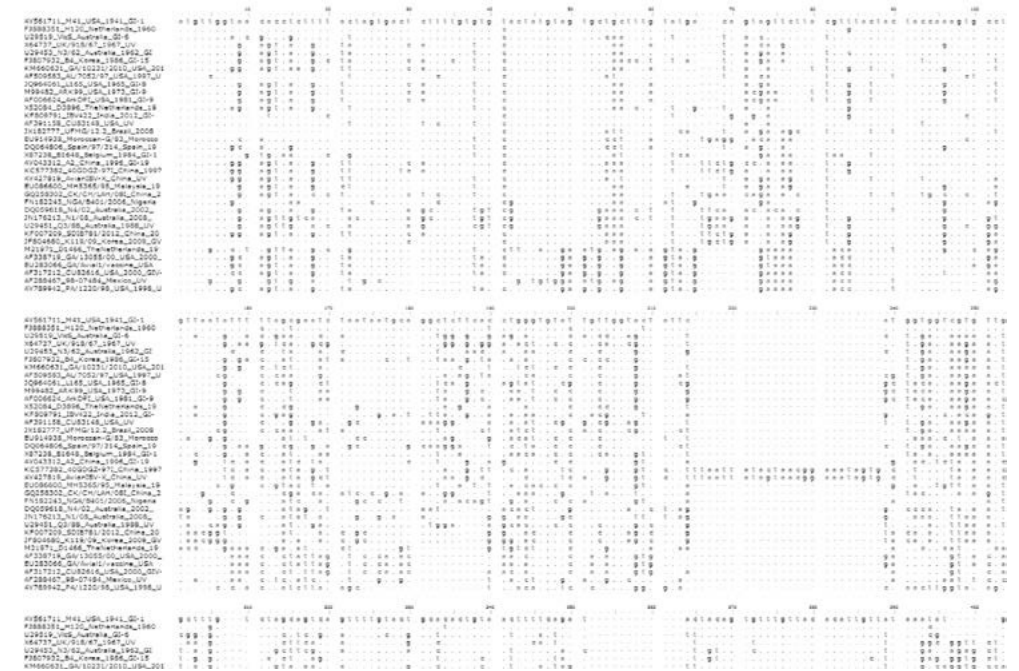


Fig.1 esempio di allineamento della porzione ipervariabile HV1 del gene S1

Per ovviare a questo ci sono alcune possibili soluzioni:

a. *PCR con primers degenerati*

Utilizzare primers contenenti degenerazioni, cioè possibilità di avere per una singola posizione 2 o più nucleotidi, comporta dei rischi, infatti primers troppo degenerati garantiscono un alto spettro di omologie ma una diminuita sensibilità della metodica verso ogni singolo genotipo in quanto nella mix di primers la concentrazione di ogni singola combinazione di nucleotidi è inversamente proporzionale al numero e al tipo di degenerazioni scelte. Viceversa primers poco degenerati sono altamente sensibili verso il genotipo per il quale sono stati disegnati, ma implicano un alto rischio di falsi negativi identificando con performance minori e variabili gli altri genotipi oltre a un alto rischio di comparsa di amplificati aspecifici.

b. *PCR specifiche in zone differenti dello stesso gene*

Impiegare PCR specifiche permette di utilizzare primers poco degenerati, in questo modo si possono genotipizzare un maggior numero di campioni nonostante l'alta variabilità del gene. Con protocolli diversi si possono identificare genotipi diversi, se presenti contemporaneamente nel campione. Ogni PCR, però, ha performance proprie e indipendenti che devono fare i conti con la variabilità intrinseca in ogni genotipo: ciò ha una ricaduta sia sulla specificità che sulla sensibilità del metodo in generale. Infatti avendo come target una zona variabile,

la metodica con primers poco degenerati è per sua natura a rischio di mancato riconoscimento (*mismatches*). Ciò implica che ogni singolo protocollo PCR può mostrare maggiore affinità per alcuni ceppi e meno per altri, inoltre usando PCR differenti si ha un aumento sia di costi che di tempistiche di analisi.

Analisi della sequenza ottenuta dalla RT-PCR

Questa fase consiste innanzitutto nella valutazione della qualità della sequenza ottenuta e, se la qualità è sufficientemente buona, nella conseguente identificazione del genotipo presente nel campione in base alla sequenza ottenuta. Questi due passaggi sono cruciali per ottenere un esito corretto e comprensibile ed entrambi presentano delle criticità date principalmente dalla natura del campione.

Le sequenze sono generate dall'analisi dell'amplificato fornito dalla RT-PCR di tipizzazione e quindi, hanno qualità dipendente dalle performance di quest'ultima: la presenza di amplificati aspecifici di lunghezze diverse e non tipiche del virus ricercato (fig. 2a) compromette molto la possibilità di ottenere una sequenza accettabile. Inoltre è possibile avere una qualità molto bassa della sequenza dovuta alla presenza contemporanea di due o più virus geneticamente simili, per coinfezioni o presenza di vaccini vivi. Questa condizione causa la presenza di "rumore di fondo" nella sequenza e/o la presenza di doppi picchi nell'elettroferogramma con conseguente difficoltà di identificazione del singolo virus (fig. 2b).



Fig2a: esempio di bandeggio aspecifico in PCR **Fig2b:** esempio di elettroferogramma problematico

Un'altra criticità è legata all'attribuzione del genotipo. Questo passaggio si può effettuare tramite confronto della sequenza ottenuta con un database di sequenze certe e/o tramite analisi filogenetica, utilizzando un albero con sequenze di riferimento. In entrambi i casi la criticità maggiore è la nomenclatura dei ceppi. In figura 3 è mostrato un esempio di analisi della similarità di un campione di campo mediante *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). La tabella evidenzia che non sempre la similarità (*ident*) è riferita alla totalità della sequenza S1 del campione (*query cover*), cosa che implica una minore sicurezza nell'assegnazione del genotipo. Inoltre i primi risultati, cioè quelli più affidabili statisticamente, non sempre hanno una nomenclatura chiara e univoca cosa che alla fine comporta un problema nell'identificazione del virus e quindi delle sue caratteristiche biologiche.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Infectious bronchitis virus partial s1 gene for spike glycoprotein, S1 subunit, genomic RNA, isolate RF/05/02	215	215	93%	5e-52	82%	AJ575414.1
Infectious bronchitis virus strain N2-75 spike protein (S), 3a protein (3a), 3b protein (3b), small membrane protein (3c), membrane protein (M), 5a protein (5a), 5b protein (5b), and nucleocapsid (N) genes, complete cds	204	204	93%	1e-48	81%	DQ490208.1
Avian infectious bronchitis virus strain N2/75 S1 glycoprotein gene, partial cds	204	204	93%	1e-48	81%	U29523.1
Infectious bronchitis virus isolate SLO/809/97 spike glycoprotein S1 gene, partial cds	196	196	86%	2e-46	81%	GU246616.1
Infectious bronchitis virus partial s1 gene for spike glycoprotein, S1 subunit, genomic RNA, isolate RF/20/99	196	196	100%	2e-46	80%	AJ575406.1
Infectious bronchitis virus partial s1 gene for spike glycoprotein, S1 subunit, genomic RNA, isolate RF/04/99	193	193	100%	3e-45	79%	AJ575401.1
Infectious bronchitis virus isolate AR/10/BA/30 S1 protein (S) gene, partial cds	187	187	86%	1e-43	81%	KM658253.1
Infectious bronchitis virus strain Cal557 2003, complete genome	187	187	93%	1e-43	80%	FJ904715.1

Fig. 3: esempio di output di BLAST per un campione diagnostico

DISCUSSIONE

Per permettere di identificare correttamente e completamente i virus patogeni della IB responsabili delle problematiche riscontrate in campo, garantendo al tempo stesso un'alta qualità del risultato emesso, non si può sempre adottare un protocollo diagnostico standard ma occorre una procedura flessibile di analisi da concordare con il veterinario aziendale. Per esempio un approccio che garantisce alta affidabilità è l'applicazione consequenziale di più metodiche di amplificazione. Inizialmente si procede con una real time RT-PCR disegnata sulla zona UTR del virus della bronchite infettiva, ossia su una zona scarsamente variabile, in modo da avere la garanzia di identificare il maggior numero di genotipi.

I campioni risultati positivi alla real time RT-PCR vengono poi analizzati con alcune RT-PCR convenzionali che hanno come target il gene S1. Nello specifico la maggior

parte dei campioni possono essere identificati con una metodica one step con primers poco degenerati e, se risultassero negativi, si può eseguire una successiva PCR two steps che aumenta la sensibilità tramite una PCR nested eseguita sul precedente amplificato.

In casi particolari, in base a specifiche realtà di campo, si può procedere con una RT-PCR one step costruita all'inizio del gene S1 che, contenendo numerosi primers poco degenerati, dimostra una specificità differente dalle altre utilizzate che invece sono più ad ampio spettro oppure una o più RT-PCR specifiche per ceppi genotipicamente diversi da tutti gli altri (come il D1466) e quindi difficilmente identificabili con le metodiche più generiche.

L'approccio a processo e non ad analisi può garantire una più ampia possibilità di caratterizzazione, ma non garantisce in ogni caso un successo del 100%, ciò è dovuto a diversi fattori tra i quali i principali sono la qualità del campione all'arrivo in laboratorio e la concentrazione del virus nel campione stesso.

Tra i principali motivi di falsi negativi legati alle caratteristiche del campione si annoverano:

1) *Errata selezione del campione o momento di prelievo*

Nonostante la maggiore sensibilità delle metodiche biomolecolari, sbagliare il campionamento può portare spesso ad un esito negativo dell'esame.

2) *Acidi nucleici degradati*

Campioni prelevati da animali morti da tempo o conservati/trasportati in modo scorretto (temperature elevate per es.), in cui le nucleasi endogene o proteasi esogene (per esempio batteriche) hanno degradato gli acidi nucleici, possono risultare negativi. È sempre raccomandabile, anche per i test biomolecolari, trasportare i campioni refrigerati e nel minor tempo possibile.

3) *Presenza d'inibitori della PCR*

Alcuni campioni come il fegato o le feci sono ricchi di sostanze che inibiscono la PCR, quindi, se è possibile, scegliere altri campioni (tamponi tracheali, tonsille cecali, reni).

Bisogna infine considerare che la scelta di una real time di discriminazione ad ampio spettro con un target molecolare di dimensioni ridotte (121bp), se da un lato garantisce molta copertura, dall'altro espone a individuare dei campioni positivi che hanno una concentrazione di virus eccessivamente esigua per permettere una caratterizzazione del ceppo identificato. Inoltre in campioni mal conservati si presta a riconoscere positività non confermabili da altre metodiche con target di dimensioni superiori e quindi più esposte agli effetti negativi della degradazione. Infine la presenza di più genotipi nello stesso campione spesso genera una sequenza di bassa qualità che non permette l'identificazione dei ceppi virali presenti.

Il problema della nomenclatura non è risolvibile dal laboratorio ma bensì occorrerebbe avere una convenzione internazionale sui nomi dei ceppi. Una proposta in merito è stata fatta da Valastro *et al.*, (2016) che partendo dalle differenze geniche assegna nomi ai genotipi indipendentemente dai sierotipi. Il limite di questo approccio è la necessità di sequenziare l'intera porzione.

In conclusione è bene tener presente che la diagnosi di laboratorio della bronchite infettiva è complicata da numerosi fattori che derivano dalle caratteristiche del virus stesso, in continua evoluzione per la pressione selettiva immunitaria e fenomeni di riassortimento genico, dall'uso di vaccini vivi (a volte poco razionale), dalla

presenza nel campione di più ceppi virali di diversa origine e caratteristiche, dalla qualità del campione e della differente sensibilità e specificità delle metodiche utilizzate. Al fine di avere risposte affidabili e sensate è bene rivolgersi a laboratori esperti che di concerto con i veterinari aziendali sono in grado di mettere in atto le strategie diagnostiche più appropriate e di valutare correttamente i risultati ottenuti in modo da rispondere efficacemente alle problematiche riscontrate in campo.

BIBLIOGRAFIA

Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, Monne I.(2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. In: Infect Genet Evol. 349-64.

PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA EMOPARASSITI IN SPECIE DI AVIFAUNA SELVATICA IN EMILIA ROMAGNA

Fregnani G.¹, Massi P.¹, Fiorentini L.¹, Tosi G.¹, Romboli C.¹, Bocciero R.¹, Scaravelli D.¹, Parigi M.¹

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

Abstract

Although the presence and the effects of Haemoparasites in feral birds are widely studied in various parts of the world, data on their diffusion in Italy are scarce. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *Haemoproteus/Plasmodium* and *Leucocytozoon* in feral pigeons (*Columba livia*) and magpies (*Pica pica*) of the Emilia-Romagna region. A total of 215 spleens collected from culled or dead animals were screened using a nested polymerase chain reaction (nPCR) that amplifies a partial segment of the mitochondrial cytochrome *b* gene of these parasites. Magpies resulted significantly more parasitized by *Leucocytozoon* spp than pigeons (70.3% vs 5.1%), whereas both species presented a similar prevalence of *Haemoproteus/Plasmodium* spp. (24.3% vs 23%). A small percentage of animals was infected by both parasites (7.5%), mainly represented by magpies. Among pigeons, the prevalence of the parasites was significantly different in the geographical areas investigated. Further genomic studies are necessary in order to evaluate the parasites species and the lineages circulating among this population of feral birds.

INTRODUZIONE

Le infezioni parassitarie esercitano una forte pressione di selezione nei confronti dei loro ospiti e sono responsabili delle dinamiche coevolutive dei meccanismi di difesa dell'ospite e dell'adattamento del parassita a questi (Dieckmann 2002).

Numerosi studi, europei e mondiali, riguardanti la ricerca di emoparassiti nell'avifauna selvatica e no (Al-Barwari and Saeed 2012), hanno riportato che oltre il 50% delle diverse specie di uccelli esaminati risulta infetto; gli emoparassiti più frequentemente ricercati e studiati appartengono ai tre generi *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, (Atkinson and van Riper 1991) tutti trasmessi mediante la puntura di insetti ematofagi vettori. Clinicamente, negli uccelli selvatici, tali infezioni possono risultare inapparenti o presentarsi con sintomi blandi quali inappetenza, dimagrimento e debolezza, che possono essere riscontrati più frequentemente negli animali giovani (Ozmen and Haligur 2005; Zhang et al. 2014). Inoltre, è importante tener conto del fatto che molto spesso tali ospiti sono infettati simultaneamente da diverse specie di parassiti e che proprio queste coinfezioni sono tra le maggiori cause dell'evoluzione della virulenza (Arriero and Moller 2008).

Per quanto concerne l'Italia, gli unici dati disponibili sull'argomento sono stati riportati in due recenti lavori dell'Università di Torino che riportano la prevalenza di questi generi di emoparassiti in piccioni e cornacchie grigie abbattuti nella suddetta provincia (Scaglione et al. 2015; Scaglione et al. 2016).

Nel nostro studio, per la prima volta, abbiamo osservato la distribuzione e la prevalenza di *Haemoproteus spp./Plasmodium spp.* e *Leucocytozoon spp.* in columbidi e

corvidi rinvenuti sul territorio della provincia di Forlì- Cesena nell'ambito del Piano di Monitoraggio Sanitario della fauna selvatica in Emilia Romagna.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra febbraio e maggio del 2016 sono state conferite presso la sezione di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) 215 carcasse di columbidi e corvidi raccolti in diverse aree della provincia di Forlì-Cesena (FC) nell'ambito del Piano di Monitoraggio Sanitario della fauna selvatica in Emilia Romagna.

Ai fini della ricerca degli emoparassiti, da ciascuna carcassa è stata prelevata la milza. Precedentemente all'estrazione del DNA, ciascun campione è stato addizionato con 1000µl di Tris-EDTA buffer solution (1X), vortexato fino alla sua completa omogeneizzazione e sottoposto a tre cicli di congelamento /scongelo per ottenere una migliore rottura tissutale. I campioni sono stati, poi, centrifugati a 3000xg per 7 minuti e dal surnatante sono stati prelevati 200µl per l'estrazione semi-automatica degli acidi nucleici mediante estrattore KingFisher Flex (Thermo Scientific) utilizzando il Kit Biosprint ALL IN ONE VET (Qiagen).

L'estratto è stato analizzato mediante una nested PCR (nPCR) in grado di amplificare un segmento parziale del citocromo b mitocondriale dei parassiti del genere *Haemoproteus/Plasmodium* e *Leucocytozoon* (Hellgren et al. 2004).

Con la prima PCR (HaemNFI-5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'; Haem NF3 5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') è stato amplificato un tratto del DNA mitocondriale comune a tutte e tre le specie di parassiti, mentre nella seconda PCR sono state utilizzate due diverse coppie di primers, una specifica per i generi *Haemoproteus* e *Plasmodium* (HaemF 5'-TGGTGCTTTCGATATATGCATG-3'; HaemR2 5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') (Bensch et al. 2000) e l'altra specifica per il genere *Leucocytozoon* (HaemFL 5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3'; HaemR2L 5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') (Hellgren et al. 2004).

Nella prima PCR sono stati utilizzati 5µl di templat di estrazione, mentre nella seconda PCR il templat era costituito da 3 µl di amplificato della prima PCR. La reazione di amplificazione ha previsto un'incubazione di 15 minuti a 95°C seguita da 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 45 secondi a 72°C per 20 cicli nella prima PCR e 35 nella seconda PCR, con un'elongazione finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti della seconda PCR sono stati fatti correre su un gel di agarosio all'1,7% ed i campioni sono stati considerati positivi in presenza di una banda di 480 bp per *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. e di 478 bp per *Leucocytozoon* spp.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante software SPSS v.20 (SPSS Inc., Chicago, IL). L'associazione tra il sesso, la specie o il luogo di ritrovamento è stata valutata utilizzando il test del chi-quadro oppure il test esatto di Fisher ed è stato considerato statisticamente significativo un valore di p inferiore o uguale a 0.05.

RISULTATI

Dei 215 animali conferiti, l'82.8% (178/215) erano piccioni (*Columba livia*) ed il 17,2% (37/215) gazze (*Pica pica*), catturati ed abbattuti in 2 ambiti territoriali di caccia (ATCFO1 e ATCFO2) della Provincia di Forlì-Cesena nell'ambito del Piano di Monitoraggio della Fauna Selvatica della regione Emilia-Romagna (Tabella 1). In particolare, all'interno dell'ATCFO1 gli animali erano stati abbattuti in 7 diverse frazioni di 3

diversi comuni (Forlì, Forlimpopoli e Meldola), mentre tutti gli animali nell'ATCFO2 erano stati abbattuti nella stessa frazione del comune di Cesena (Calisese). Tutte le gazze analizzate (37/215) provenivano unicamente da due località dell'ATCFO1 (Tabella 1), mentre i piccioni provenivano da 6 zone dell'ATCFO1 e dall'unica dell'ATCFO2. Il 32.1% (69/215) dei campioni analizzati è risultato positivo per almeno un emoparassita, con il 62.3% (43/69) rappresentato da piccioni ed il 37.7% (26/69) da gazze (p=0.00). Nello specifico per *Haemoproteus/Plasmodium*, sono risultati positivi il 24.3% (9/37) delle gazze ed il 23% (41/178) dei piccioni (p>0.05), mentre per *Leucocytozoon* sono risultati positivi il 70.3% (26/37) delle gazze ed il 5.1% dei piccioni (9/178) (p=0.00) testati. Il 7.5% (16/215) degli animali è risultato infetto per entrambi i parassiti, in particolare il 24.3% delle gazze (9/37) ed il 3.9% dei piccioni (7/178) (p=0.001). Per entrambe le specie animali non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra la prevalenza di infezione ed il sesso.

Per quanto riguarda la prevalenza di infezione per *Haemoproteus/Plasmodium* e *Leucocytozoon* nelle diverse aree geografiche, nelle gazze non sono state rilevate differenze statisticamente significative (Tabella 1). Al contrario, nei piccioni, la prevalenza di infezione sia per *Haemoproteus/Plasmodium* sia per *Leucocytozoon* è risultata diversa nelle varie zone (p=0.00) con gli animali abbattuti nel comune di Forlimpopoli (frazione Selbagnone) che presentavano i più alti valori di prevalenza 26.8% (11/41) per *Haemoproteus/Plasmodium* e quelli abbattuti nel comune di Meldola, 66.7% (6/9), per *Leucocytozoon*. Al contrario, tutti i piccioni abbattuti nell'ATCFO2 sono risultati negativi per entrambe le ricerche.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stata ricercata, per la prima volta, la presenza degli emoparassiti aviari *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. e *Leucocytozoon* spp. in alcune aree della provincia di Forlì-Cesena. Nonostante il substrato più idoneo per la ricerca di tali parassiti sia rappresentato dal sangue periferico, l'aver a disposizione unicamente animali abbattuti o rinvenuti morti sul territorio ci ha vincolato all'utilizzo della milza; tale organo, come già dimostrato da Scaglione et al. (2015 e 2016), si è rivelato, comunque, un buon substrato di analisi, essendo di facile prelievo ed ampiamente perfuso. La nostra ricerca si è concentrata sulle due specie aviari che maggiormente, nel nostro territorio, sono sottoposte a controllo di popolazione, il piccione (*Columba livia*), il cui stato di infezione viene da tempo studiato in diverse aree geografiche, Italia compresa, e la gazza (*Pica pica*), corvide per il quale, invece, sono disponibili scarse informazioni in letteratura.

Dal confronto dei dati da noi ottenuti con quelli di Scaglione et al., (2015), nei piccioni la prevalenza di infezione è risultata inferiore sia per *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. (23% vs 29.4%) sia per *Leucocytozoon* spp., (5.1% vs 15.7%). Per quanto riguarda i dati relativi alla prevalenza degli stessi parassiti nelle gazze, il confronto è stato fatto con un'altra specie di corvide, la cornacchia grigia, analizzata sempre da Scaglione et al. nel 2016. Nonostante la prevalenza di infezione da noi ottenuta sia risultata nuovamente inferiore per entrambe le ricerche parassitarie, 24.3% vs 59.6% per *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. e 70.3% vs 97.9% per *Leucocytozoon* spp., anche nel nostro territorio *Leucocytozoon* spp. è risultato essere maggiormente presente nei corvidi rispetto ai columbidi. Degno di osservazione è anche il riscontro di una bassa presenza di coinfezioni negli animali analizzati (7.5%; 16/215), in quanto la

contemporanea presenza di due o più emosporidi risulta, invece, essere comune nella fauna selvatica (Jarvi et al. 2002). Ad ogni modo, le gazze sono risultate la specie che con più frequenza ha presentato coinfezioni (56.3%; 9/16); considerando che proprio queste coinfezioni sono tra le maggiori cause dell'evoluzione della virulenza di un parassita (Arriero and Moller 2008), è necessario procedere con l'analisi genomica dei campioni positivi così da avere informazioni più precise circa il loro impatto sul sistema immunitario degli animali ospiti.

Valutando le differenze di prevalenza in base al sesso degli animali, diversi gruppi di ricerca sostengono che le femmine siano sottoposte ad una maggiore pressione parassitaria a causa dei loro ridotti spostamenti durante il periodo riproduttivo, indicativamente da marzo a ottobre (Valkiunas G. 2005; Al-Barwari and Saeed 2012). Queste differenze non sono state rilevate nel nostro studio, nonostante il periodo di campionamento coincidesse con la prima parte del periodo riproduttivo di entrambe le specie aviarie analizzate. Questo non stupisce per quanto riguarda i piccioni, in quanto entrambi i sessi partecipano alla cova delle uova; diversamente nelle gazze, dove la cova delle uova viene effettuata unicamente dalle femmine, possiamo ipotizzare un'elevata presenza dei vettori di trasmissione, in particolare di *Leucocytozoon* oppure che i momenti infettivi avvengano durante le fasi di aggregazione quando entrambi i sessi si riuniscono in gruppi numerosi post-riproduttivi.

Per quanto riguarda le differenze in termini di prevalenza nelle diverse aree, gli animali (sia piccioni sia gazze) catturati nella zona pedecollinare del comune di Meldola hanno presentato elevate prevalenze sia per *Leucocytozoon* spp. (66.7% e 61.5% rispettivamente) sia per *Haemoproteus/Plasmodium* (24.4% e 77.8% rispettivamente) facendo ipotizzare una maggior presenza, in quest'area, dei vettori di trasmissione, rappresentati da ditteri della famiglia dei Simuliidae), dei Ceratopogonidae e da zanzare dei generi *Culex*, *Aedes* e *Culiseta* (Zhang et al. 2014). Tale ipotesi viene avvalorata dalle recenti segnalazioni, nella medesima area, di alcuni focolai di leishmaniosi canina ed umana, anch'essa malattia protozoaria trasmessa mediante la puntura di ditteri ematofagi del genere *Phlebotomus*. In futuro, ulteriori indagini di tipo genomico ci potranno delucidare sulle specie di *Haemoproteus/Plasmodium* e *Leucocytozoon* spp. circolanti, sulla eventuale presenza di *lineages* parassitari in grado di infettare contemporaneamente diversi ospiti e sulla loro origine filogenetica.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Barwari, S. and S. Saeed (2012). "The Parasitic Communities of the Rock Pigeon *Columba livia* from Iraq: Component and Importance." *Turkiye Parazitol. Derg.* **36**(232-239).
- Arriero, E. and A. P. Moller (2008). "Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds." *J Evol Biol* **21**(6): 1504-1513.
- Atkinson, C. T. and C. van Riper III (1991). Pathogenicity and epizootiology of avian ematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon and Haemoproteus. *Bird-parasite interactions: Ecology, Evolution and Behaviour*. O. U. Press. Oxford, UK.: 19-48.
- Bensch, S., M. Stjernman, et al. (2000). "Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds." *Proc Biol Sci* **267**(1452): 1583-1589.

- Dieckmann, U. (2002). Adaptive dynamics of pathogen-host interaction. *Adaptive dynamics of infectious diseases*. C. U. Press. Cambridge, UK.
- Hellgren, O., J. Waldenstrom, et al. (2004). "A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood." *J Parasitol* **90**(4): 797-802.
- Jarvi, S. I., J. J. Schultz, et al. (2002). "PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines." *J Parasitol* **88**(1): 153-158.
- Ozmen, O. and M. Haligur (2005). "A Study on the Presence of Leucocytozoonosis in Wild Birds of Burdur District." *Turk J Vet Anim Sci.* **29**: 1273-1278.
- Scaglione, F. E., F. T. Cannizzo, et al. (2016). "Blood parasites in hooded crows (*Corvus corone cornix*) in Northwest Italy." *Vet Ital* **52**(2): 111-116.
- Scaglione, F. E., P. Pregel, et al. (2015). "Prevalence of new and known species of haemoparasites in feral pigeons in northwest Italy." *Malar J* **14**: 99.
- Valkiunas G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. Boca Raton, CRC Press.
- Zhang, Y., Y. Wu, et al. (2014). "Prevalence patterns of avian Plasmodium and Haemoproteus parasites and the influence of host relative abundance in southern China." *PLoS One* **9**(6): e99501.

Specie	ATCFO	Comune	Frazione	Altitudine	N°positivi in ciascuna area/ totale positivi per H/P (*)	N°positivi in ciascuna area/ totale positivi per Leucocytozoon
GAZZE	1	Forlì	Branzolino	14m s.l.m	22.2% (2/9)	38.5% (10/26)
	1	Meldola	/	58m s.l.m	77.8% (7/9)	61.5% (16/26)
PICCIONI	2	Cesena	Calisese	49m s.l.m	0% (0/41)	0% (0/9)
	1	Forlì	Casemurate	18m s.l.m	9.8% (4/41)	0% (0/9)
	1	Meldola	/	58m s.l.m	24.4% (10/41)	66.7% (6/9)
	1	Forlì	Pievequinta	19m s.l.m	9.8% (4/41)	11.1% (1/9)
	1	Forlì	Ravaldino	150m s.l.m	22% (9/41)	11.1% (1/9)
	1	Forlimpopoli	S. Leonardo	26m s.l.m	7.3% (3/41)	0% (0/9)
	1	Forlimpopoli	Selbagnone	35m s.l.m	26.8% (11/41)	11.1% (1/9)

Tabella 1: N° gazze e piccioni positivi per ciascuna specie parassitaria nelle diverse zone geografiche. (*)H/P: Haemoproteus spp. e Plasmodium spp.

LA M.I.C. UTILE STRUMENTO DI MONITORAGGIO DELL'ANTIBIOTICO SENSIBILITÀ. L'ESPERIENZA CON IL *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

Gobbo F.¹, Tonellato F.¹, Moronato M.L.¹, Rizzi S.¹, Catania S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 - Laboratorio di Medicina Aviare, Unità Operativa Micoplasmi, Viale dell'Università, 10, 35020, Legnaro, Padova (PD)

Summary

Mycoplasma gallisepticum (MG) is an important pathogen of the poultry industry causing respiratory disease in chicken, turkey and minor avian species. MG infection is related to high economic losses, not only due to drug-costs for the containment of clinical signs and secondary bacterial infections, but also to high carcass condemnations and worse food conversion rates. Antimicrobial treatment for MG still represents an eligible way to control the pathogen, but in order to guarantee an efficient and rational use of antibiotics pathogens should be tested via ASTs (*Antimicrobial Susceptibility Tests*) before their use in the field. The M.I.C. (*Minimum Inhibitory Concentration*) via microbroth dilution method is considered the gold standard and the only test applicable to these fastidious microorganism. The aim of the present study is to share the MIC results of different MG field strains isolated in the Italian poultry industry. Thus, 49 *Mycoplasma gallisepticum* strains, collected between 2010 and 2017 (25=turkey, 21=chicken, 3=minor avian species) were tested for different drugs using commercial plates with antibiotics on demand. The M.I.C. results of the MG strains tested between 2010-2011 evidenced a profile of resistance to the drug enrofloxacin and signs of multi-drug resistance for macrolides as well as lincomycin. On the other hand, the M.I.C. data (2010-2011) showed the MG susceptibility to tetracyclins, especially to doxycyclin. Basing on these M.I.C. results the laboratory suggested a change in the drug approach to front the infection caused by this pathogen. During the period 2013-2016, the M.I.C. data showed a maintained susceptibility to doxycycline and a gradual shift towards susceptibility values for macrolides expanding the range of antibiotics principles available for MG treatment. Moreover, it highlights how the MIC could be a useful tool for a conscious and effective use of drugs in the field avoiding the development of antibiotic resistance mechanism.

INTRODUZIONE

Mycoplasma gallisepticum (MG) è considerato un importante patogeno respiratorio della specie pollo, tacchino e delle specie avicole definite minori. Nel pollo è responsabile della CRD (*Chronic Respiratory Disease*) e nel tacchino della Sinusite Infraorbitale Infettiva. Nella gallina ovaioia è responsabile di forme respiratorie, che possono essere associate, in funzione della patogenicità del ceppo, anche a importanti seppur temporanei cali della ovodeposizione. Come per altri micoplasmi aviari la trasmissione può avvenire per via orizzontale (tramite contatto diretto od indiretto) e per via verticale, ed una volta instaurata l'infezione, la malattia ha la tendenza alla cronicizzazione. In corso di infezione gli indici di morbilità sono



elevati mentre gli indici di mortalità possono essere variabili (in funzione dell'età dei soggetti e della copresenza di altri agenti infettivi virali o batterici o a specifiche condizioni ambientali, quali elevata densità animale, ventilazione, qualità della lettiera). L'impatto economico è nella maggior parte dei casi associato ad un aumento degli scarti al macello principalmente per le infezioni secondarie alla micoplasmosi (*in primis E. coli*), inoltre gli animali affetti possono presentare un calo del consumo di alimento e un peggioramento dell'indice di conversione alimentare. Ulteriori costi sono relativi al contenimento della forma clinica da MG o a quelli legati all'insorgenza di infezioni batteriche secondarie (*E.coli*, *Ornithobacterium rhinotrachealis*, *Riemerella* spp., etc.). Consci del suo importante ruolo patogeno e delle conseguenti perdite economiche, il controllo di questo patogeno è sempre stato di primaria importanza nei vari settori produttivi industriali e nello specifico nel settore da riproduzione mediante la costituzione ed il mantenimento di gruppi MG-free. Tale pratica gestionale ha sempre rappresentato un punto cardine nella strategia di controllo di questo patogeno e degli altri micoplasmi importanti per l'industria avicola, inoltre l'attuazione di specifici piani nazionali di controllo ed eradicazione nei confronti di MG hanno portato ad una notevole diminuzione della sua prevalenza in diversi paesi europei o extraeuropei. In recenti pubblicazioni da parte di autori appartenenti al continente africano ed asiatico si evince invece come il *Mycoplasma gallisepticum* rappresenti ancora un importante patogeno ad elevato impatto economico-sociale. La strategia di controllo delle micoplasmosi respiratorie può includere, in funzione della situazione epidemiologica e della realtà produttiva o di altri fattori di natura commerciale, la messa in atto di una o più azioni (eradicazione-depopolazione, compartimentalizzazione, biosicurezza, profilassi indiretta-vaccinazione e terapia antibiotica mirata). Data l'importante forma clinica che si può sviluppare nel gruppo affetto e la possibilità di insorgenza di infezioni secondarie, il trattamento antibiotico per MG può essere considerato una prassi consolidata specialmente nel settore da carne. Trovandoci di fronte ad una puntuale e corretta richiesta di un uso razionale del farmaco da parte delle istituzioni nazionali e comunitarie, per il Medico Veterinario risulta di fondamentale importanza conoscere la sensibilità *in vitro* agli antimicrobici dei ceppi patogeni circolanti. Tale approccio è volto a garantire il successo terapeutico e benessere animale nel gruppo affetto, evitare l'utilizzo di farmaci considerati non efficaci sulla base dei risultati degli studi *in vitro* o nello specifico non operare ulteriori pressioni selettive per farmaci o classi di antibiotici che presentano evidenza di diminuita suscettibilità nel tempo e soprattutto per quelli antibiotici considerati "critically important". A tal fine, per avere una stima della sensibilità o della resistenza di un determinato microrganismo agli antimicrobici, si può utilizzare il calcolo della M.I.C. (Minima Concentrazione Inibente), poiché considerata dalla comunità scientifica il *gold-standard* tra gli ASTs (*Antimicrobial Susceptibility Tests*). Inoltre tale metodica è l'unico AST applicabile a microrganismi fastidiosi come i micoplasmi. Il laboratorio di medicina aviaria effettua lo studio di MIC in micoplasmi aviari e di altri settori zootecnici dal 2010, ciò ha consentito l'istituzione di un *database* interno la cui valutazione ha consentito di evidenziare presenza/assenza di efficacia per determinate molecole antibiotiche e di valutare nel tempo eventuali fluttuazioni della sensibilità dei ceppi circolanti nei confronti di specifici antibiotici o classi di antibiotici. Ne consegue che tale *test* laborato-

ristico possa rappresentare un'utile risorsa a supporto delle attività professionali del veterinario di campo. Lo scopo del presente lavoro è quello di condividere l'applicazione di uno strumento dinamico come la M.I.C. per la valutazione e il monitoraggio della antibiotico sensibilità di ceppi patogeni dell'industria avicola italiana e nello specifico di *Mycoplasma gallisepticum*.

Materiali e Metodi

49 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* sono stati coltivati a partire da campioni tracheali di animali industriali presentanti segni clinici o lesioni anatomopatologiche compatibili con micoplasmosi, i ceppi selezionati per tale studio appartengono a diversi anni (2010-2017) e nello specifico 25 sono afferenti alla specie tacchino (51%), 21 alla specie pollo (43%) e 3 ceppi (3%) a specie avicole minori (oca e gallina faraona). Per eseguire il *test*, l'inoculo batterico (10^4 UCC/ML) è stato dispensato in piastre commerciali da 96 pozzetti con antibiotici *on demand* (Merlin Diagnostika®), incubate a $37\pm 1^\circ\text{C}$ fino alla rilevazione di crescita nel pozzetto denominato controllo positivo (inoculo batterico in assenza di sostanze ad azione antimicrobica). Si riporta di seguito gli antibiotici presenti nella piastra con relativi *breakpoints* di sensibilità e resistenza ($\mu\text{g/ML}$) disponibili in letteratura: doxiciclina ($\leq 4, \geq 16$), enrofloxacin ($\leq 0.5, \geq 2$), eritromicina ($\leq 0.5, \geq 8$), florfenicolo ($\leq 2, \geq 8$), lincomicina ($\leq 0.5, \geq 4$), ossitetraciclina ($\leq 4, \geq 16$), spiramicina ($\leq 2, \geq 8$), tiamulina ($\leq 8, \geq 16$), tilmicosina ($\leq 8, \geq 32$) e tilosina ($\leq 1, \geq 4$). I risultati MIC sono stati integrati con i valori di *breakpoints*, permettendo di classificare l'isolato come sensibile, intermedio o resistente all'antibiotico testato e quindi a fornire evidenze *in vitro* dell'efficacia di diverse molecole antibiotiche e quindi supportare il clinico nella scelta del farmaco. Si è proceduto inoltre a calcolare la MIC 50 e MIC 90 dei ceppi, cioè rispettivamente il valore di MIC capace di inibire la crescita del 50% e 90% dei ceppi testati di *M. gallisepticum*.

Risultati

Nei grafici sottostanti si riportano alcuni esempi di valutazione dell'andamento nel tempo (2010-2017) dell'antibiotico sensibilità dei 49 ceppi di MG per alcune molecole antibiotiche testate, classificandoli come sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R).

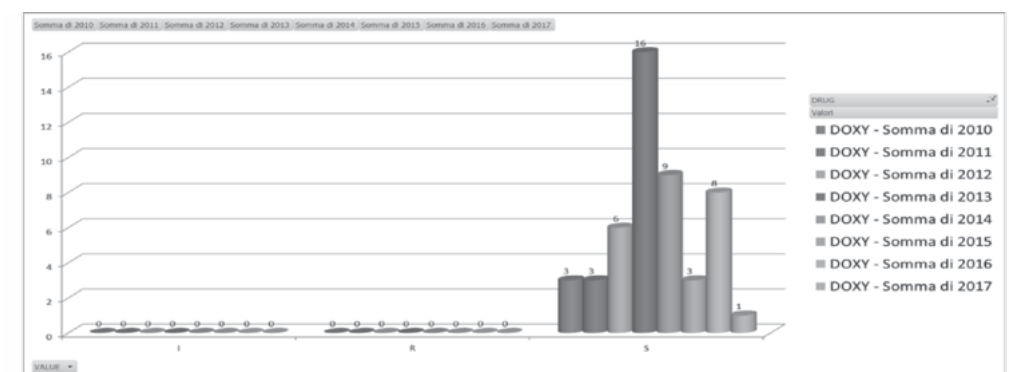


Grafico 1. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico doxiciclina

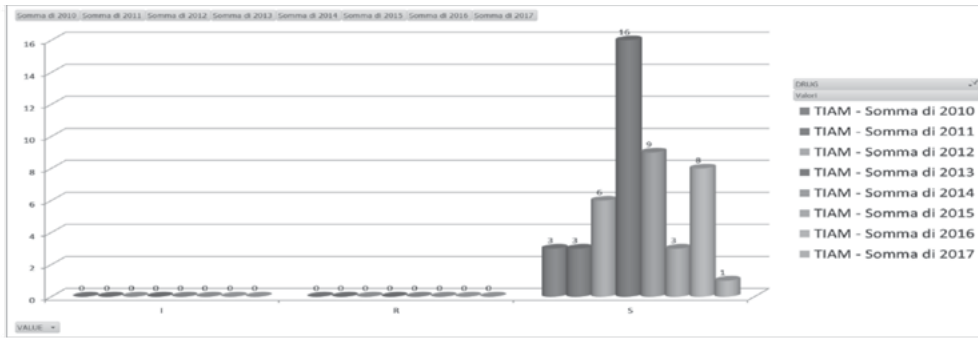


Grafico 2. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico tiamulina

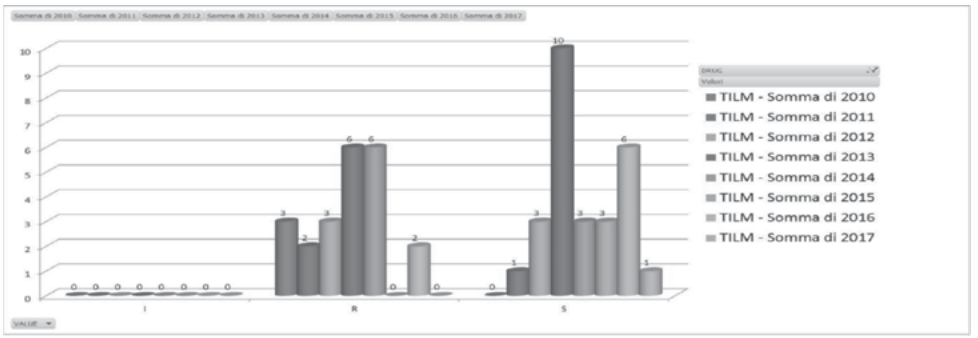


Grafico 5. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico tilmicosina

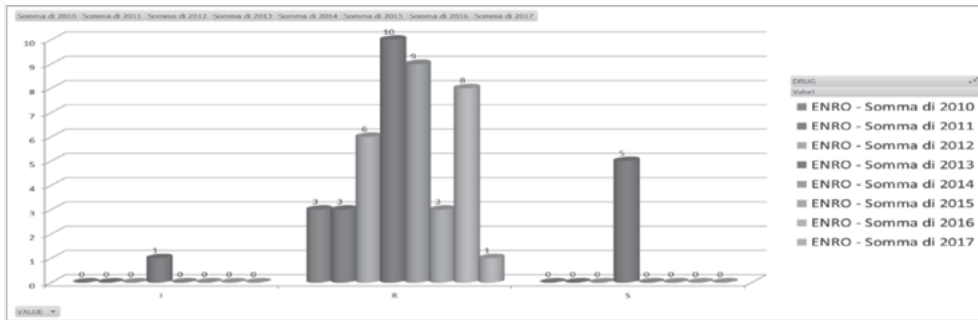


Grafico 3. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico enrofloxacin

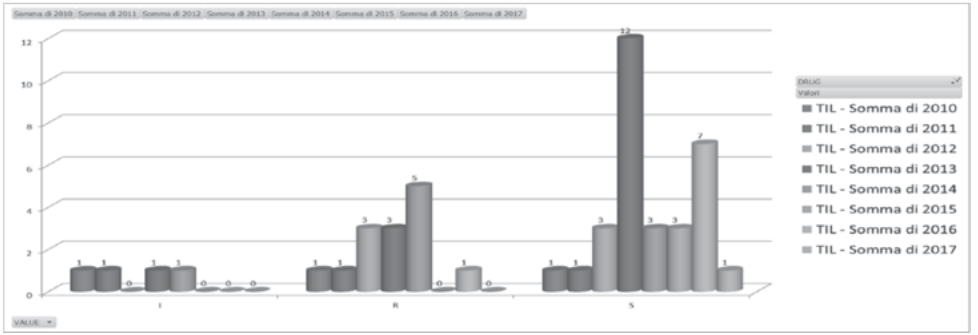


Grafico 6. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico tilosina

In tabella 1 si riportano invece i valori di MIC 50 e 90 dei 49 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* utilizzati nello studio per diverse molecole antibiotiche.

Tab. 1 dati di MIC 50 e 90 delle singole molecole antibiotiche dei 49 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* isolati dal 2010-2017

ABT	MIC50 (µg/ML)	MIC90 (µg/ML)
Doxy	0,5	1
Enro	>16	>16
Eri	<0,5	>8
Flor	2	2
Linco	8	>32
Ossi	4	16
Spira	<0,5	16
Tiam	0,03125	0,125
Tilm	0,0625	>32
Til	0,03125	4

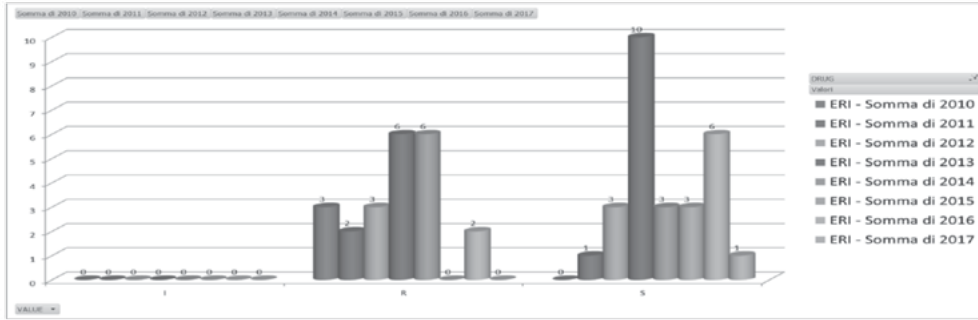


Grafico 4. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico eritromicina

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Dai dati prodotti è stato possibile evincere che durante il biennio 2010-2011 le possibilità terapeutiche per MG risultavano essere molto limitate e le uniche molecole che mostravano efficacia *in vitro* appartenevano alla classe delle tetracicline e alla tiamulina, derivato delle pleuromutiline. È interessante notare come molecole considerate storicamente utili per il trattamento di tale patogeno come l'enrofloxacin e i macrolidi, manifestavano elevati valori di MIC. La produzione e diffusione di tali dati congiuntamente ai risultati terapeutici in campo hanno probabilmente stimolato un cambio di mentalità nell'approccio alla terapia antibiotica nei gruppi affetti da *Mycoplasma gallisepticum*, evidenziando come prima scelta terapeutica le tetracicline (e nello specifico la doxiciclina) o la tiamulina e limitando quindi l'utilizzo di farmaci di classi considerate meno efficaci.

È interessante notare come i risultati MIC delle diverse molecole nel tempo ed in particolare nel periodo successivo al 2013, mostrano una mantenuta e buona sensibilità dei ceppi di MG per le tetracicline (nello specifico per la doxiciclina, tale dato è confermato anche dai suoi dati di MIC 50 e 90 presenti in tab. 1, ed una elevata e mantenuta sensibilità per la tiamulina. Risulta interessante evidenziare che a partire dal 2013 la frequenza di isolati o popolazioni microbiche considerate sensibili alla classe dei macrolidi (eritromicina, spiramicina, tilmicosina e tilosina) è risultata sicuramente maggiore mostrando un cambiamento del profilo di farmacosenibilità. Valori inferiori di MIC sono stati evidenziati a partire da tale anno anche per il licosamide testato, seppur classificato ancora come resistente. Contrariamente a quanto evidenziato in tali classi di molecole i dati MIC riguardanti il fluorochinolone testato (enrofloxacin) non hanno mostrato sostanziali cambiamenti in termini di sensibilità o resistenza anche se i valori di MIC sembrano essere leggermente inferiori negli ultimi anni. Naturalmente tali dati dovranno essere confermati dal tempo per chiarire se realmente un progressivo declino dei valori MIC si sta consolidando almeno nel territorio italiano nei ceppi circolanti di *Mycoplasma gallisepticum*, mentre la differente tipologia di comportamento tra macrolidi e fluorochinoloni potrebbe essere spiegata dal diverso meccanismo di resistenza acquisita: mutazione A2058G o A2059G nel dominio V del gene 23S rRNA per i macrolidi, mentre per i fluorochinoloni un meccanismo un po' più complesso in cui la mutazione dei geni DNA girasi e topoisomerasi IV è associata a sostituzioni amminoacidiche nelle proteine GyrA, GyrB e ParC.

Risulta importante sottolineare che i profili di antibiotico sensibilità possono variare in funzione della specie batterica testata, della origine geografica del ceppo e delle diverse categorie produttive. Quindi la raccolta dei dati MIC, finalizzata a generare un *database* storico aziendale o di filiera, dovrebbe essere applicata ai principali micoplasmi aviari di interesse industriale (*M. gallisepticum* e *M. synoviae*), poiché sulla base dei nostri dati le differenze in termini di sensibilità e/o resistenza alle varie classi antibiotiche possono essere anche notevoli.

Concludendo la M.I.C applicata a questi microrganismi e la sua valutazione nel tempo può fornire utili informazioni al campo per la corretta gestione del patogeno, attraverso un utilizzo più razionale del farmaco fondato su dati di laboratorio. Tale approccio congiunto tra libero professionista e laboratorio potrebbe contribuire alla diminuzione del consumo di antibiotici in campo zootecnico e a evitare pressioni selettive, svolgendo quindi un ruolo proattivo nella lotta alla AR. Parallelamente,

tali dati risulterebbero un'utile risorsa per la comunità scientifica come strumento di monitoraggio dello sviluppo di fenomeni di AR in micro e macro aree o in specifiche categorie zootecniche.

BIBLIOGRAFIA

- Raviv Z. And Ley H. (2013). *Mycoplasma gallisepticum* infection. Disease of Poultry 13 th Ed., 877-893
- Feberwee, A., and W. J. M. Landman. The successful implementation of *Mycoplasma gallisepticum* monitoring and control programmes in Dutch commercial poultry: a declining seroincidence during an eleven year period. In: Proc. 19th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Toulouse, France. p.153. 2012.
- Landman, W. J. M. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. Avian Pathol. 43:2-8. 2014
- Zanella A., Martino P.A., Pratelli A., Stonfer M., 1998. Development of antibiotic resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro, Avian Pathology, 27:6, 591-596
- Lysnyansky, I. Gerchman, S. Perk, and S. Levisohn Molecular Characterization and Typing of Enrofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Mycoplasma gallisepticum* Avian Diseases Dec 2008 : Vol. 52, Issue 4, pg(s) 685-689 doi: 10.1637/8386-063008-RESNOTE.1
- Irena Gerchman, Sharon Levisohn, Inna Mikula, Lucoa Manso-Silvan and Inna Lysnyansky. Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry. Veterinary Research 2011, 42:90

CONFRONTO TRA DUE SISTEMI DI CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI NELLA POLLASTRA LEGGERA: OSSERVAZIONI DI CAMPO

COMPARISON BETWEEN TWO SYSTEMS FOR CONTROL OF COCCIDIOSIS IN LIGHTWEIGHT CHICKENS: FIELD OBSERVATIONS

Grilli G.¹, Pagnoni A.¹, Calligarich C.¹, Guarneri P.², Mondella M.², Stonfer M.³

¹*Università degli Studi di Milano, Dip. di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133Milano*

²*Gruppo Avinord, Brescia*

³*Bayer Animal Health, Milano*

Summary

One of the main problems in intensive poultry farming is the coccidiosis. Since it is forbidden to administer anticoccidic molecules to laying hens for the risk of residues in eggs, new methods are being sought to counteract this pathology such as vaccination or short-term therapies in the pullet phase.

The purpose of this work was to compare two different approaches to coccidiosis implemented in a breeding farm in the province of Brescia: in the first group two-day therapy was performed on a coccidicidal molecule (Toltrazuril), instead vaccination was performed in the second group.

Through the count of faecal oocysts released and analyzed each week, we have been able to evaluate the effectiveness of the two strategies. In this study, there were no significant differences in the prevention and control of coccidiosis between short-term treatment and vaccination, but in order to avoid the drug resistance problem, we might decide to make alternating cycles between the two control systems

INTRODUZIONE

La coccidiosi è una malattia parassitaria causata da protozoi che infettano numerose specie animali. In particolare, i coccidi che colpiscono gli avicoli fanno parte del Phylum Apicomplexa, genere *Eimeria* e comprendono nove specie: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. preacox* e *E. tenella*.

La coccidiosi in allevamento è praticamente impossibile da eliminare, in quanto è ubiquitaria, possiede un'elevata diffusione ambientale ed un alto grado di resistenza alle diverse condizioni atmosferiche e ai disinfettanti. I coccidi, una volta ingeriti, si sviluppano e moltiplicano rapidamente all'interno delle cellule epiteliali del tratto intestinale per poi essere nuovamente espulsi sotto forma di oocisti, che infettano altri animali e l'ambiente circostante.

La gravità della malattia può essere influenzata da diversi fattori tra cui il parassita e il genotipo dell'ospite, la numerosità e l'età della dose di oocisti, il sistema di gestione del pollame, il livello significativo di oocisti sporulate e la precedente storia di esposizione (Blake, 2015).

La coccidiosi è tipica degli allevamenti ad alto indice di affollamento ambientale, come i moderni allevamenti avicoli intensivi, in particolare quelli a terra (Asdrubali *et al.*, 1996). Gli animali più colpiti sono i soggetti giovani: dopo il primo contatto

essi sviluppano un'immunità e rimangono protetti contro ulteriori infezioni. La prevenzione e il controllo di questa patologia parassitaria si deve basare innanzitutto su una corretta gestione dell'allevamento, seguendo le norme di biosicurezza e i vuoti sanitari. Altri metodi per prevenire la coccidiosi sono l'utilizzo di molecole anticoccidiche, che possono essere coccidiostatici o coccidiocidi, con una somministrazione continua o di breve durata oppure si può ricorrere alla vaccinazione. Particolare attenzione va riservata alla profilassi anticoccidica nelle pollastre leggere dato che è vietata la somministrazione di molecole anticoccidiche alle galline ovaiole in produzione. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la prevenzione della coccidiosi attuata in un allevamento di pollastre leggere utilizzando due diversi approcci: terapia di 2 giorni con una molecola anticoccidica confrontata con la vaccinazione.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata effettuata presso un allevamento a terra di 40.000 pollastre leggere situato nella provincia di Brescia. Gli animali sono stati suddivisi in due capannoni identici per struttura e densità di animali: nel primo gruppo è stato effettuato il trattamento di breve durata con il Toltrazuril, (triazone simmetrico ad azione anticoccidica efficace contro tutte le specie di *Eimeria* che interessano gli avicoli). Esso è stato somministrato tra la 3° e la 4° settimana post-accasamento, al dosaggio di 7 mg/kg di peso vivo nell'acqua di abbeverata per 48 ore consecutive. Nel secondo gruppo è stata effettuata la vaccinazione alla 1° settimana *post* accasamento con un vaccino vivo attenuato, costituito da una sospensione stabilizzata di oocisti sporulate appartenenti a 5 specie diverse (*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* e *Eimeria tenella*).

Il campionamento è stato eseguito una volta a settimana a partire dal 1° giorno *post* accasamento raccogliendo rispettivamente 2 campioni per ciascun gruppo per 12 settimane, a partire dal 18/05/2016 e fino al 03/08/2016, per un totale di 48 campioni. Ogni campione conteneva almeno 100 feci fresche, di cui almeno 1/2 ciecali. I campioni di feci sono stati prelevati in diversi punti dei capannoni in modo tale da determinare con più precisione la contaminazione ambientale da oocisti. Successivamente i campioni sono stati trasportati refrigerati a +4°C nel laboratorio del Dipartimento di Medicina Veterinaria, sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria dell'Università degli Studi di Milano, dove sono stati analizzati entro 24 ore. La conta copro-microscopica è stata eseguita utilizzando il metodo di McMaster secondo le procedure standard internazionali. Alla 5° settimana post-accasamento è stato svolto il Lesion Scoring, con la metodica indicata da Johnson e Reid (1970) e l'esame istologico, attraverso il campionamento casuale e il sacrificio di 10 pollastre con la valutazione delle lesioni microscopiche secondo le metodiche indicate da Idris *et al.* (1997a, b) e da Goodwin *et al.* (1998). Durante il periodo di prova sono state registrati i seguenti parametri: mortalità cumulativa, peso medio alla fine del periodo e tasso di uniformità.

RISULTATI

Campionamento e conta delle oocisti

Per quanto riguarda la conta delle oocisti, l'andamento delle emissioni nei due gruppi è abbastanza regolare, in quanto si può notare come nel primo gruppo (trattato con toltrazuril) ci sia un leggero rialzo delle oocisti verso la 3° settimana post-accasa-

mento dove sono state raggiunte circa 24.000 OPG, seguito da un successivo calo. Mentre nel secondo gruppo (trattato con vaccino) si nota un picco più tardivo, intorno alla 5° settimana post-accasamento, con un'emissione di oocisti doppia (circa 50.000 OPG) rispetto al trattamento precedente; i controlli seguenti hanno mostrato un calo nelle settimane successive (Grafico 1).

Lesion Scoring ed esame istologico

Durante la 5° settimana post-accasamento è stato effettuato il Lesion Scoring, ovvero sono state scelte e sacrificate casualmente 10 pollastre (5 del primo gruppo e 5 del secondo) e sottoposte a necropsopia immediata. Il tratto intestinale è stato osservato in maniera macroscopica ed è stato dato un punteggio alle lesioni da 0 (assenza di lesioni) a 4 (presenza di gravi lesioni). Nel primo gruppo si sono verificate alcune lesioni nel tratto dell'ileo e del cieco, con valutazioni di 2/3 e assenza o leggere lesioni nel duodeno e digiuno, con valutazioni di 0/1. Mentre nel secondo gruppo si è notato in un solo soggetto importanti danni a livello di duodeno con una valutazione di 3. Oltre all'osservazione macroscopica dei tratti intestinali, sono stati prelevati dei campioni dal tessuto intestinale da duodeno, digiuno, ileo e cieco per ogni soggetto sottoposto a necropsopia e sono stati valutati istologicamente dopo l'inclusione di paraffina. Nel primo gruppo si è notata la presenza di qualche granulocita, epitelii leggermente infiammati, qualche forma gametogonica in fase finale e alcune oocisti deformate in regressione nella cellula ospite. Nel secondo gruppo, invece, si è verificata mediamente la presenza di un 25% di villi positivi ai coccidi.

Mortalità, pesi e uniformità del gruppo

Il tasso di mortalità riscontrato nel periodo di accrescimento è stato del 1,44% nel primo gruppo e del 1,55% nel secondo. Il peso medio raggiunto dagli animali è stato del 1,271 kg nel primo gruppo, con un'uniformità del 87,5%, e 1,270 kg nel secondo gruppo, con un'uniformità del 80%.

DISCUSSIONE

La coccidiosi, malattia causata da parassiti specie-specifici del genere *Eimeria*, è una patologia comune nell'industria del pollame che produce importanti danni economici derivanti dalle perdite delle performance degli animali e dai sistemi di controllo della coccidiosi (Price, 2012).

Nell'allevamento delle galline ovaiole è vietato somministrare farmaci anticoccidici, in quanto vi è il rischio di trovare dei residui nelle uova. Perciò il controllo e la prevenzione della coccidiosi deve essere attentamente applicata o attraverso la vaccinazione dei pulcini in incubatoio, o mediante la somministrazione di farmaci anticoccidici nell'allevamento della pollastra leggera. Da qualche anno si stanno conducendo studi per paragonare l'efficacia di alcuni prodotti anticoccidici rispetto ai vaccini per poter, in caso di necessità, alternare i programmi.

In questo studio non si sono verificate differenze significative nella prevenzione e nel controllo della coccidiosi tra la vaccinazione e il trattamento di due giorni con il toltrazuril. Ma, mentre il vaccino, che contiene cinque delle sette specie di *Eimeria* che colpiscono il pollo, deve essere facilmente somministrabile perché potrebbe portare disomogeneità dell'immunità e possibilità di avere forme cliniche e quindi perdite economiche, il toltrazuril è efficace contro tutte le specie di *Eimeria* e contro tutti gli stadi di sviluppo del parassita e la via di somministrazione è più semplice. L'utilizzo del toltrazuril è di breve durata, quindi è fondamentale individuare con precisione

i due giorni ottimali per somministrare agli animali il trattamento: infatti, fornire il farmaco prematuramente non permette l'instaurarsi di una efficace immunità, mentre effettuare il trattamento in maniera tardiva può non essere adeguato nella prevenzione della coccidiosi e portare a gravi perdite economiche per l'avicolto.

Questo studio ha dimostrato l'effettiva efficacia del trattamento di breve durata con toltrazuril per il controllo della coccidiosi. Durante il ciclo, nel primo gruppo a cui è stato somministrato il farmaco tra la 3° e 4° settimana, l'emissione delle oocisti si è notevolmente ridotta, mantenendo quantità molto basse anche nei campionamenti successivi (dal 5° campionamento in poi) fino ad arrivare ad un minimo di 550 oocisti al 12° campionamento, segnale dell'instaurarsi di una buona immunità negli animali. Nella ricerca condotta da Grief (2000) è stata infatti dimostrata l'interazione tra somministrazione di toltrazuril e sviluppo dell'immunità naturale. Gli stadi endocellulari del parassita danneggiati rimangono nella cellula ospite per lungo tempo ed agendo come antigeni stimolano il sistema immunitario. Queste osservazioni sono confermate anche dagli esami istologici da noi effettuati in quanto erano visibili stati gametogonici deformati e in via di regressione anche nei nostri campioni contrariamente a quanto visto nei soggetti del gruppo vaccinato.

Questa raggiunta immunità probabilmente ha inciso positivamente anche sulle performances produttive in quanto questo gruppo ha ottenuto un'uniformità di peso a fine ciclo migliore e una mortalità lievemente inferiore. Nel secondo gruppo, invece, è stata effettuata la vaccinazione con un vaccino vivo attenuato che ha permesso di prevenire il rischio di sviluppo di forme cliniche di coccidiosi limitando anche il danno alle cellule intestinali indotto dai coccidi. La prova ha confermato l'efficienza dell'uso del vaccino contro la coccidiosi, mostrando un andamento delle emissioni di oocisti in crescita fino ad ottenere un picco alla 5° settimana post-accasamento comunque notevole (fino a 50.000 oocisti emesse), seguito da un drastico calo (1700 oocisti emesse alla 12° settimana post-accasamento).

La valutazione del Lesion Scoring in entrambi i gruppi ha attestato la presenza di lesioni non gravi nei tratti intestinali degli animali sacrificati, quindi sia il toltrazuril che la vaccinazione hanno eliminato efficacemente i coccidi permettendo alla mucosa intestinale di riparare i danni subiti. Successivamente a questa valutazione, è stato effettuato un esame istologico che, confrontato con i risultati del Lesion Scoring, ha rilevato la presenza di infezioni coccidiche in tratti intestinali non macroscopicamente alterati.

CONCLUSIONI

La coccidiosi è una patologia parassitaria molto comune all'interno dell'allevamento avicolo intensivo che causa elevate perdite economiche. Per quanto riguarda la prevenzione e il controllo di questa malattia nell'allevamento della gallina ovaioia è necessario agire sulla filiera della pollastra leggera, prima delle 16 settimane di vita. Un'ottima alternativa, efficace ed economica, rispetto alla vaccinazione è l'utilizzo del toltrazuril. Si è notato che questo trattamento di breve durata ha dato risultati molto positivi per il controllo della coccidiosi, riducendo l'escrezione di oocisti, abbassando la contaminazione ambientale e prevenendo la forma clinica, subclinica e la mortalità. Inoltre, questa molecola anticoccidica permette la comparsa dell'immunità naturale contro i coccidi, rimanendo protettiva per tutta la vita dell'animale. Per evitare il fenomeno della farmaco-resistenza, che si può verificare con l'uso

continuo della terapia in ogni ciclo di allevamento, si potrebbe decidere di effettuare cicli alternati di vaccinazione e trattamento con toltrazuril. Questa opzione porterebbe a ridurre drasticamente i fenomeni di resistenza dei parassiti in allevamento, oltre a ridurre le contaminazioni ambientali.

BIBLIOGRAFIA

1. Asdrubali G., Coletti M. e Sannipoli C.G.T. Malattie da protozoi. In: Patologia aviaria (pp.195-209) Asdrubali, Pitagora Ed. Bologna, 1996.
2. Blake D.P. Eimeria genomics: where are we now and where are we going? *Veterinary Parasitology* 212: 68-74, 2015.
3. Goodwin MA, Brown J, Bounous DI. Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect *Eimeria maxima* in chickens. *Avian Pathology*, 27: 405-08, 1998
4. Greif G. Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. *Parasitol. Res.* 86: 787-790, 2000.
5. Idris AB, Bounous DI, Goodwin MA, Brown J, Krushinskie EA. Quantitative pathology of small intestinal coccidiosis caused by *Eimeria maxima* in young broilers. *Avian Pathology*, 26: 731-747, 1997a.
6. Idris AB, Bounous DI, Goodwin MA, Brown J, Krushinskie EA. Lack of correlation between microscopic lesion scores and gross lesion scores in commercially grown broilers examined for small intestinal *Eimeria* spp. coccidiosis. *Avian Diseases*, 41: 388-391, 1997b.
7. Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: *lesion scoring* techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*, 28: 30-36, 1970.
8. Price K.R. Use of live vaccines for coccidiosis control in replacement layer pullets. *Poult. Res.* 21: 679-692, 2012.

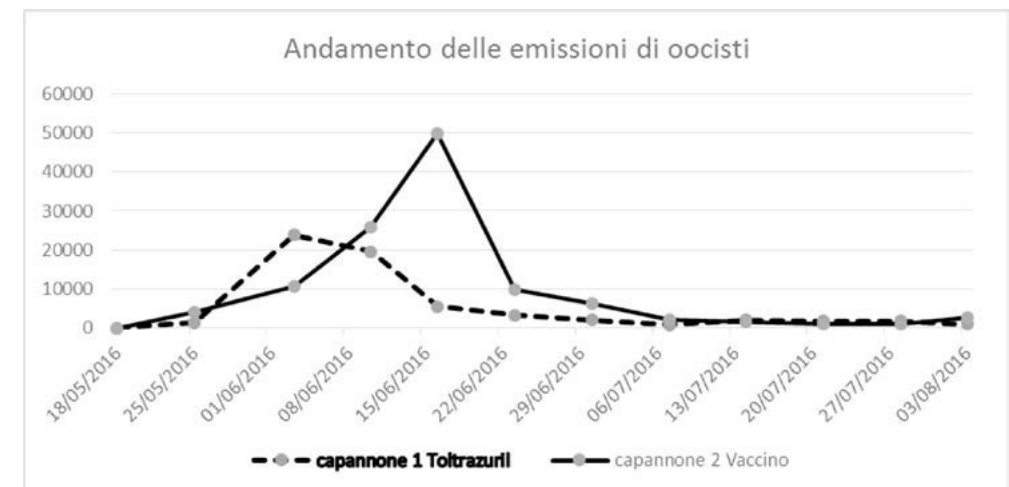


Grafico 1. Andamento medio delle emissioni delle oocisti.

OSSERVAZIONI SULLA PRESENZA DI CAMPYLOBACTER TERMOFILI NELLE STRUTTURE DI ALLEVAMENTO E NEI BROILERS

Grilli G.¹, Calligarich C.¹, Ferrazzi V.¹, Trapani A.², Tirloni E.³, Stella S.³

¹ Università degli Studi di Milano, Dip. di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano

² Veterinario Aziendale.

³ Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare.



Summary

Remarks on the presence of thermophilic *Campylobacter* in breeding facilities and broilers.

In this paper, we sought to obtain information on the colonisation of *Campylobacter* in some broiler groups used for breeding purposes and the presence of these bacteria in equipment used and the surrounding environment in order to acquire a better understanding of possible measures to be taken to avoid contamination. The trial was carried out over a period of 2 fattening cycles (spring-summer) in a breeding facility equipped with 3 sheds with identical equipment, dimensions, and subjects (hybrid ROSS 308 from the same incubator containing approximately 14,900♀, 10,000♂ and 10,000♂, respectively). Sampling was carried out weekly by the same operator using swabs, both within the facilities themselves (walls, drinking troughs, and feeding troughs), and on the animals. This was conducted from when the subjects were placed in brooder pens until slaughtering. In the first breeding cycle, the presence of *campylobacter* was observed in the animals at 14 days old while the facilities were contaminated at 3 weeks. In the second breeding cycle, colonisation took place a week later in both the animals and their surrounding environment. All instances of isolation made it possible to identify *Campylobacter coli*. The possible sources of contamination and the procedures to be adopted to ensure prevention will be discussed.

INTRODUZIONE

I *Campylobacter* termofili costituiscono un grave rischio per la salute umana in quanto principale causa di tossinfezione nelle popolazioni degli Stati Membri dell'Unione Europea (circa 230.000 casi nel 2015). La carne avicola è considerata la principale fonte di contaminazione per l'elevata prevalenza che questi batteri hanno negli allevamenti avicoli, soprattutto broilers. Già nel 2008, l'Unione Europea aveva condotto un'indagine con lo scopo di verificare la prevalenza di *Campylobacter* in carcasse di pollo. A questa ricerca hanno aderito ben ventisei Stati Membri dell'Unione Europea, oltre a Norvegia e Svizzera. Il batterio, in ogni paese partecipante, era stato isolato dalle carcasse di pollo da carne con una prevalenza media pari al 75,8%. Diversi studi sono stati intrapresi per diminuire la contaminazione delle carcasse al macello anche in funzione di una imminente direttiva europea che fisserà dei limiti di contaminazione nelle carcasse degli animali macellati. Varie ricerche condotte e le numerose opinioni di esperti degli ultimi 25 anni, indicano infatti che il controllo del *Campylobacter* nella catena

di produzione della carne di pollo, partendo dall'allevamento, dovrebbe ridurre la Campylobacteriosi umana (Tustin *et al.*, 2011). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di indagare l'andamento della contaminazione degli animali e delle strutture di allevamento al fine di identificare le possibili fonti di origine del batterio e le eventuali misure di prevenzione da adottare per evitare l'infezione da Campylobacter termofili nei broilers.

MATERIALI E METODI

Allevamento e animali

L'allevamento oggetto del controllo è sito in Piemonte ed è composto di 4 capannoni per broilers e un allevamento di bufale da latte con annesso caseificio. Per questo lavoro sono stati controllati i capannoni 1, 2 e 3 che sono coetanei ed identici dal punto di vista delle attrezzature e delle dimensioni (10 x 100 m); il capannone 4 era vuoto. Ogni capannone, dotato di ventilazione naturale, possedeva 2 linee di mangiatoie antispreco e 2 linee di abbeveratoi a nipple. Il capannone 1 aveva accasato circa 14.900 broilers femmine mentre il 2 ed il 3 contenevano circa 10.000 broilers maschi, tutti gli animali appartenevano allo stesso ibrido ROSS 308 e provenivano dallo stesso incubatoio. In occasione dei sopralluoghi settimanali, venivano sottoposti a necropsia gli animali ritrovati deceduti nella giornata in collaborazione con il veterinario aziendale.

Campionamento e analisi

Nel corso di questo studio sono stati seguiti 2 cicli di allevamento (maggio/luglio, agosto/settembre) e il campionamento è avvenuto, a partire dall'accasamento, con cadenza settimanale ed è stato effettuato sempre dallo stesso operatore fino alla macellazione dei soggetti. Il campionamento prevedeva l'uso di tamponi Transystem Film-Amiens (Oxoid-ThermoFisher) con terreno di trasporto di Amiens senza carbone. Questi tamponi venivano inumiditi e strisciati sulle pareti, sugli abbeveratoi e sulle mangiatoie. Ogni campionamento per capannone prevedeva il controllo di non meno di 20 mangiatoie e 50 abbeveratoi distribuiti lungo la lunghezza del capannone e almeno 10 m lineari di parete in prossimità della lettiera. Nel contempo venivano anche raccolte delle feci fresche direttamente dalla lettiera, con particolare attenzione a recuperare feci ciecali, ed inserite in sacchetti sterili. Ogni campionamento prevedeva l'acquisizione di almeno 50 feci per capannone. Per ogni ciclo di allevamento, sono stati raccolti e utilizzati in totale 126 campioni (42 campioni di mangiatoie/abbeveratoi, 42 campioni di pareti dei capannoni e 42 campioni fecali). I tamponi e i campioni fecali, una volta raccolti venivano messi in un frigorifero portatile collegato alla presa elettrica dell'auto e trasportati a temperatura controllata in laboratorio nel più breve tempo possibile (circa 2 ore di viaggio). L'isolamento di Campylobacter è stato eseguito sia con la metodica ISO 10272-1 che la procedura microbiologica suggerita dall'O.I.E. (2008).

Una selezione delle colonie con i caratteri tipici di *Campylobacter* termofili, precedentemente isolate tramite tecniche colturali, sono state sottoposte ad analisi mediante PCR per identificare la prevalenza delle due specie principali: *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. La metodica utilizzata ha seguito il protocollo proposto da Denis *et al.* (2001).

RISULTATI

I ripetuti campionamenti hanno permesso di rilevare la presenza di *Campylobacter* termofili in tutti i capannoni ed in entrambi i cicli monitorati. I risultati sono riportati in tabella I che mostra come nel primo ciclo di allevamento le prime positività, nelle feci, si sono riscontrate nel capannone 2 già a partire dai 14 gg di età mentre nel II ciclo l'infezione è avvenuta una settimana più tardi. Nel I ciclo la contaminazione delle strutture (mangiatoie e abbeveratoi) sembra essere avvenuta intorno alla 4 settimana di allevamento mentre nel ciclo successivo alla 5 settimana. Poche positività si sono riscontrate nelle pareti dei capannoni (fig. 1).

L'identificazione di specie ha permesso di rilevare la presenza di *Campylobacter coli* nel I ciclo e *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nel secondo ciclo campionato

DISCUSSIONE

La scelta di campionare questo allevamento era data da positività delle carcasse prelevate al macello su polli provenienti da questo sito di produzione nei cicli precedenti. Una potenziale fonte di *Campylobacter*, infatti, è la presenza di un precedente gruppo di animali positivi al patogeno nello stesso capannone in allevamento. Il *Campylobacter* da un gruppo positivo si diffonde ampiamente in allevamento e nelle zone intorno ad esso. Di conseguenza, il rischio di infettare il successivo gruppo è direttamente correlato all'efficienza di pulizia e disinfezione del capannone e alla distanza temporale tra l'uscita del primo gruppo di polli e l'introduzione del secondo gruppo (vuoto sanitario). Considerando i risultati del campionamento in allevamento in due cicli successivi, si può osservare che la presenza di *Campylobacter* è risultata decisamente superiore nei campioni fecali. Infatti, nelle altre tipologie di campioni (campioni di mangiatoia, abbeveratoio e parete) la presenza del microrganismo è risultata essere molto bassa. Tale fatto si presenta probabilmente a causa di una differenza nella carica di concentrazione di *Campylobacter* nelle varie tipologie di campione (il batterio si sviluppa meglio su alcuni substrati come il contenuto ciecale piuttosto che altri e, quindi, il ritrovamento e l'isolamento risultano difficoltosi). Nel nostro caso si è assistito, nel I ciclo controllato, un'infezione precoce; è noto che per infettare un pollo siano necessarie anche solo 35 cfu di *C. jejuni*. Dopo l'ingestione, il batterio raggiunge il cieco e si moltiplica velocemente entro ventiquattro ore dal'ingresso (Coward *et al.*, 2008). Diversi Autori segnalano che la maggior parte dei gruppi di broilers viene colonizzato tra le due e quattro settimane di età (van Gerwe *et al.*, 2009), probabilmente a causa della presenza di anticorpi materni che rallentano l'infezione precoce (Sahin *et al.*, 2003). Negli allevamenti di polli esistono molteplici potenziali fonti di infezione per quanto riguarda questi batteri, infatti, essi possono persistere e moltiplicarsi in svariati ospiti e possono sopravvivere in alcuni ambienti (Lyngstad *et al.*, 2008).

Alcuni fattori di rischio sono spesso coinvolti indipendentemente dal paese considerato o dalla solidità del disegno di studio. Questi fattori primari includono la stagione, l'aumentare dell'età di macellazione, la mancanza o carenza nei sistemi di biosicurezza, il diradamento (soltanto parziale), la presenza di gruppi di varie età in azienda, l'allevamento di specie diverse e l'utilizzo di una stabulazione di tipo estensivo (parzialmente all'aperto). Altri fattori

di rischio sono implicati in modo più discontinuo. Questi includono l'uso di acqua non potabile, la mancanza di consapevolezza dell'allevatore per quanto riguarda l'importanza di biosicurezza, l'utilizzo di antibiotici e la presenza di insetti o parassiti. Questi fattori di rischio secondari possono essere correlati maggiormente alla gestione di pratiche specifiche o addirittura alla posizione geografica. Nel nostro caso si potrebbe pensare ad una carenza nelle disinfezioni tra un ciclo e l'altro anche se le strutture si sono dimostrate positive solo successivamente all'infezione negli animali, alla presenza comunque di altre specie di allevamento (bufali) potenzialmente portatori così come carenze nelle biosicurezze (portoni aperti a luglio e agosto per facilitare la ventilazione che permettono l'entrata di volatili selvatici e di insetti). Sicuramente i cicli da noi seguiti dovrebbero avere la prevalenza maggiore in quanto la temperatura esterna calda favorisce la colonizzazione come dimostrato da diversi Autori (Jore *et al.*, 2010). Anche le strutture di allevamento come abbeveratoi e mangiatorie sono risultate contaminate; queste osservazioni sono confermate anche da Cox e Pavic, (2009) che hanno notato ad es., come gli abbeveratoi nipples con raccogli goccia sono più spesso contaminati rispetto a quelli senza.

Un allevamento di tipo convenzionale, essendo moderno, ben tenuto e possedendo un accesso limitato, dovrebbe essere considerato sicuro dal punto di vista della trasmissione di malattie infettive. Se le misure di biosicurezza non sono rigorosamente e costantemente attuate, come potrebbe essere il nostro caso, il *Campylobacter*, o come altri agenti patogeni, viene trasportato dall'esterno all'interno dell'allevamento per poi diffondersi tra gli animali e perpetuare la contaminazione nei cicli successivi

CONCLUSIONI

La campylobatteriosi di origine alimentare è la zoonosi più frequente nei paesi industrializzati. I broilers sono comunemente considerati come l'ospite naturale dei *Campylobacter* termofili e il consumo di carne contaminata, la principale fonte delle tossinfezioni alimentari umane. Il pulcino nasce senza *Campylobacter* a livello intestinale ma dopo 10-14 giorni inizia ad infettarsi a causa della presenza di questi batteri a livello ambientale. Questo si traduce in una elevata contaminazione delle carcasse durante le procedure di macellazione. La prevenzione di questa contaminazione deve iniziare con interventi volti a limitare la colonizzazione intestinale da *Campylobacter* già a partire dagli allevamenti che devono adottare misure di controllo specifiche soprattutto a livello di biosicurezza. In accordo con quanto affermato da Hermans *et al.* (2011), sono necessari ulteriori studi che meglio mettano in evidenza i punti deboli dell'allevamento che devono essere maggiormente controllati per impedire o limitare l'infezione.

BIBLIOGRAFIA

1. Cox J.M., Pavic A., 2009. Advances in enteropathogen control in poultry production. *J. Appl. Microbiol.* 108:745–755. 35
2. Coward C., van Diemen P.M., Conlan A.J.K., Gog J.R., Stevens M.P., Jones M.A., Maskell D.J., Competing isogenic *Campylobacter* strains exhibit

variable population structures in vivo. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:3857-3867.

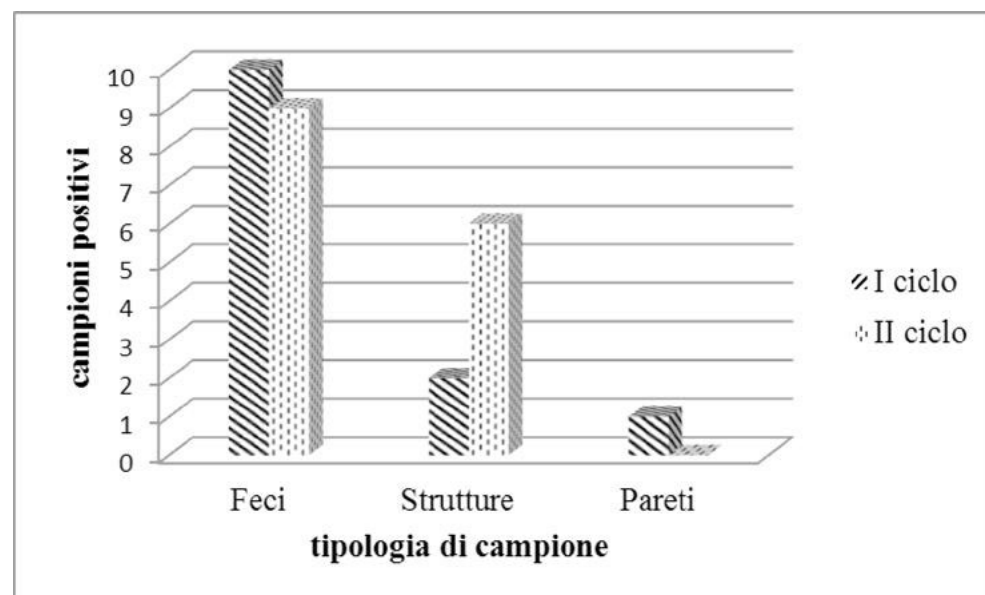
3. Denis M., Refregier-Petton, J., Laisney, M.J., Ermel, G., Salvat, G. (2001) *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 255–267.
4. Hermans D., Van Deun K., Messens W., Martel A., Van Immerseel F., Haesebrouck F., Rasschaert G., Heyndrickx M., Pasmans F., *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet Microbiol.* 2011 Sep 28;152(3-4):219-28.
5. Jore S, Viljugrein H, Brun E, Heier BT, Borck B, Ethelberg S, Hakkinen M, Kuusi M, Reiersen J, Hansson I, Engvall EO, Løfdahl M, Wagenaar JA, van Pelt W, Hofshagen M. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007. *Prev Vet Med* 2010;93:33–4
6. International Standard ISO 10272-1. Microbiologia degli alimenti e dei mangimi animali — Metodo orizzontale per il rilevamento e l'enumerazione di *Campylobacter* spp.
7. Lyngstad T. M., Jonsson M. E., Hofshagen M., Heier B. T., Risk Factors Associated with the Presence of *Campylobacter* Species in Norwegian Broiler Flocks. *2008 Poultry Science* 87:1987–1994
8. Sahin O, Luo N, Huang S, Zhang Q: Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69:5372-5379.
9. Stern NJ, Bailey JS, Blankenship LC, Cox NA, McHan F: Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca. *Avian Dis* 1988, 32:330-334
10. Tustin J., Laberge K., Michel P., Reiersen J., Daðadóttir S., Briem H., Hardardóttir H., Kristinsson K., Gunnarsson E., Fridriksdóttir V., Georgsson E., A national epidemic of campylobacteriosis in Iceland, lessons learned. *Zoonoses Public Health.* 2011 Sep;58(6):440-7.
11. van Gerwe T, Mifflin JK, Templeton JM, Bouma A, Wagenaar JA, Jacobs-Reitsma WF, Stegeman A, Klinkenberg D: Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75:625-628

Tab. 1. Risultati degli isolamenti nelle varie matrici campionate in allevamento

		I ciclo di allevamento	II ciclo di allevamento
Numero campionamento	Data campionamento/età animali	Campioni positivi a <i>Campylobacter termofili</i>	Campioni positivi a <i>Campylobacter termofili</i>
1	1 gg	-	-
2	7 gg	-	-
3	14 gg	2F	-
4	21 gg	2F	1F
5	28 gg	1F, 2F, 3S	1F, 2F,
6	35 gg	1F, 1P, 2F, 2S, 3F	1F, 1S, 2F, 2S, 3F, 3S
7	42 gg	1F, 2F, 3F	1F, 1S, 2F, 2S, 3F, 3S

Legenda: F= feci; S= strutture; P= pareti – i numeri sono riferiti ai rispettivi capannoni

Figura 1: Distribuzione di *Campylobacter termofili* nelle tre tipologie di campioni prelevati



UTILIZZO DI ALCUNI ESTRATTI VEGETALI NEL BROILER: INFLUENZA SULLO STATO SANITARIO E SULLE PERFORMANCES PRODUTTIVE

USE OF VARIOUS VEGETABLE EXTRACTS ON BROILER CHICKENS: INFLUENCE ON STATE OF HEALTH AND ON PRODUCTION PERFORMANCES

Grilli G.¹, Pasini G.¹, Calligarich C.¹, Guffanti P.², Ferrante V.², Facchetti G.³, Fasoli P.³, Pradella G.⁴, Colnago G.⁵

¹ Università degli Studi di Milano, Dip. di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133Milano;

² Università degli Studi di Milano, Dip. Scienze e Politiche Ambientali;

³ Avicola Monteverde, Brescia. ⁴ Veterinario Libero professionista; ⁵ Zaluvida Company, Malaysia.

Summary

The purpose of this experiment is to evaluate the effects of an additive containing plant extracts such as green tea (*Camellia sinensis*) and pomegranate (*Punica granatum*), rich in polyphenols, on the growth and health performance of broiler chickens.

The trial involved 46,000 ROSS hybrid broiler chickens (male and female) divided between 4 sheds, 2 of which were controlled and 2 which were treated with plant extracts administered at a dosage of 20 g/q of water from the second day of life for 5 consecutive days and then at a dose of 200 g/q of water for 3 consecutive days before each dietary change (from day 10 to day 12, from day 19 to day 21). Weight, mortality, and ICA showed no difference between the groups while the oocyst emission was statistically reduced in the groups treated with plant extracts ($P < 0.01$), showing maximum emission peaks at 28 days of life of 25,000 opg against 50,000 opg detected in the controlled group.

INTRODUZIONE

Con il 1 gennaio 2006 sono stati proibiti gli antibiotici promotori di crescita. Questi antibiotici avevano permesso, negli anni passati, di ottenere ottimi risultati produttivi, in particolare grazie alla loro azione benefica sul tratto digerente; per contro, il loro utilizzo prolungato, ha portato all'insorgenza di alcuni problemi quali lo sviluppo di batteri resistenti ai farmaci (Sorum e Sunde, 2001), la presenza di residui antibiotici nelle carni avicole e uno squilibrio della normale microflora intestinale (Andremont, 2000).

Con la proibizione del loro utilizzo, la ricerca si è indirizzata sempre di più su molecole alternative totalmente naturali, che potessero, in qualche modo, svolgere funzioni simili. L'attenzione è focalizzata, in particolare, sui metaboliti secondari delle piante, ovvero composti presenti solo in specifici organismi o gruppi di organismi. Le principali classi di metaboliti secondari comprendono: polichetidi e acidi grassi, fenoli, terpeni e steroidi, fenil propanoidi, alcaloidi, amminoacidi e peptidi specializzati, carboidrati specializzati (Hanson, 2003).

La presente sperimentazione ha come scopo la valutazione degli effetti di un additivo contenente estratti di piante, quali tè verde (*Camelia sinensis*) e melagrana (*Punica granatum*), ricchi in polifenoli, sulle performances di crescita e sulla salute di polli da carne.

In particolare è stata valutato l'effetto che tale associazione ha sulle capacità di controllare l'infezione da coccidi, in sinergia con i comuni additivi anticoccidici utilizzati negli allevamenti nazionali.

MATERIALI E METODI

La presente sperimentazione è stata condotta presso un allevamento di polli da carne situato nella provincia di Brescia e si è basata sulla valutazione degli effetti di un prodotto a base di estratti vegetali di tè verde (*Camellia sinensis*) e melagrana (*Punica granatum*), sullo stato di salute e sulle performances zootecniche degli animali.

Sono stati utilizzati 46.091 pulcini, di cui 16.791 femmine e 29.300 maschi, ibridi commerciali ROSS 308; all'arrivo sono stati suddivisi in quattro gruppi differenti (C1, C2, C4 e C5) e posti in quattro capannoni separati. Strutturalmente, i capannoni 1 e 2 (C1 e C2) sono delle medesime dimensioni mentre 5 e 6 (C5 e C6) sono di dimensioni maggiori. Due capannoni, 1 e 2, sono dotati di ventilazione laterale (trasversale), mentre i capannoni 5 e 6 presentano un sistema di ventilazione longitudinale. Durante la prova i polli sono stati alimentati *ad libitum* secondo il programma alimentare dei polli da carne che prevede quattro fasi distinte: starter (0-12 giorni), grower 1° periodo (13-21 giorni), grower 2° periodo (22-30 giorni) e un ulteriore periodo alimentare, finisher, che corrisponde agli ultimi giorni di allevamento prima della macellazione, nei quali non è presente l'anticoccidico. I coccidiostatici additivati nel mangime erano differenti a seconda del periodo del ciclo produttivo: il mangime starter conteneva Nicarbazina al dosaggio di 125 mg per Kg di mangime, il grower 1° periodo conteneva Narasin e Nicarbazina (Maxiban G160), al dosaggio totale di 625 mg per Kg di mangime e il grower 2° periodo presentava Monensis sodio (Elancoban 200), al dosaggio di 100 mg/Kg; il mangime finisher, precedente alla macellazione, quindi dal 31° giorno di età, era assolutamente privo di molecole coccidiostatiche. Gli animali sono stati suddivisi in quattro gruppi sperimentali: C1 e C5 (trattati) rappresentano i polli a cui è stato somministrato il prodotto fitoterapico, mentre C2 e C6 (controllo) non hanno ricevuto alcun trattamento naturale.

Il prodotto testato, a base di estratti di foglie tè verde e buccia di melagrana, è stato introdotto nell'acqua di bevanda, ed è stato fornito agli animali dei gruppi trattati al dosaggio di 20 g/q di acqua a partire dal secondo giorno di vita per 5 giorni consecutivi e, successivamente, al dosaggio di 200 g/q di acqua per 3 giorni consecutivi prima di ogni cambio di dieta; cioè rispettivamente da starter a grower 1° periodo, quindi dal giorno 10 al giorno 12, e da grower 1° periodo a grower 2° periodo, e quindi dal giorno 19 al giorno 21. La prova ha avuto una durata complessiva di sei settimane, dall'accasamento dei pulcini (giorno 0) all'avvio al macello (giorno 45), nel corso delle quali gli animali hanno seguito il disegno sperimentale sopracitato; durante la prova sono stati effettuati i seguenti rilievi e prelievi:

Peso.

Settimanalmente, sono stati pesati 100 animali per capannone, in maniera del tutto casuale, dall'arrivo in allevamento fino al 30° giorno di età (giorno 7, 14, 21, 30). Inoltre, sono stati forniti i pesi degli animali pre-macellazione, per valutare l'accrescimento raggiunto dai broilers a 30, 42, 50 giorni di allevamento

Mortalità.

Veniva valutata e registrata giornalmente e veniva calcolata la percentuale di mortalità per ogni capannone e quindi per ogni gruppo.

FCR (Feed conversion ratio).

La media della conversione di mangime veniva calcolata mediante il rapporto tra il consumo totale di mangime e il peso raggiunto dagli animali, ed è stata valutata per ogni gruppo.

Conta oocisti fecali.

Il campionamento delle feci è stato eseguito ogni settimana, dall'accasamento dei pulcini fino al 42 giorno di vita, la conta delle oocisti è stata effettuata mediante la camera di conta di McMaster (Conway e McKenzie, 2007).

Rilievi necroscopici.

Alla 5ª settimana di allevamento, dopo l'avvio al macello di una quota di animali, ci sono stati forniti dal macello stesso i visceri intestinali di 5 polli per capannone; su questi è stato eseguito il *lesion scoring*, per la valutazione della gravità delle lesioni macroscopiche da *Eimeria*

Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati mediante Anova utilizzando il pacchetto statistico SPSS vers. 24.

RISULTATI

Le performances zootecniche sono riportate in Tabella I; il peso medio è calcolato al 45 gg di vita;

nessuna differenza statisticamente significativa è stata registrata nei gruppi controllati per quanto riguarda questi parametri.

	C 1 (t)	C 2 (c)	C 5 (t)	C 6 (c)
Peso medio (kg)	3.169	3.09	3.04	3.058
ICA	1.7	1.64	1.66	1.63
Mortalità 1ª sett	0.79	0.86	0.8	0.59
Mortalità tot (%)	4.42	4.69	3.78	3.3

Per quanto riguarda l'andamento dell'emissione di oocisti dei gruppi C1 e C2, i risultati sono riportati in Figura 1. L'analisi statistica ha mostrato differenze significative tra i gruppi a partire dal 3° controllo (21 gg di vita) fino alla macellazione con $P < 0,01$.

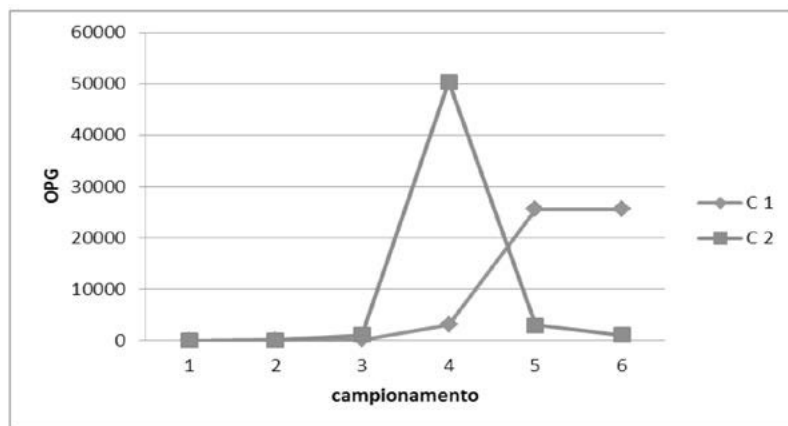


Figura 1. Andamento dell'emissione di oocisti nei gruppi C 1 e C2.

Per quanto riguarda l'andamento dell'emissione di oocisti dei gruppi C 5 e C 6, i risultati sono riportati in Figura 2. L'analisi statistica ha mostrato differenze significative tra i gruppi al 4° controllo (28 gg di vita) in corrispondenza con il picco massimo di emissioni di oocisti che si è mantenuto molto più basso nel gruppo trattato C 5 ($P < 0,01$).

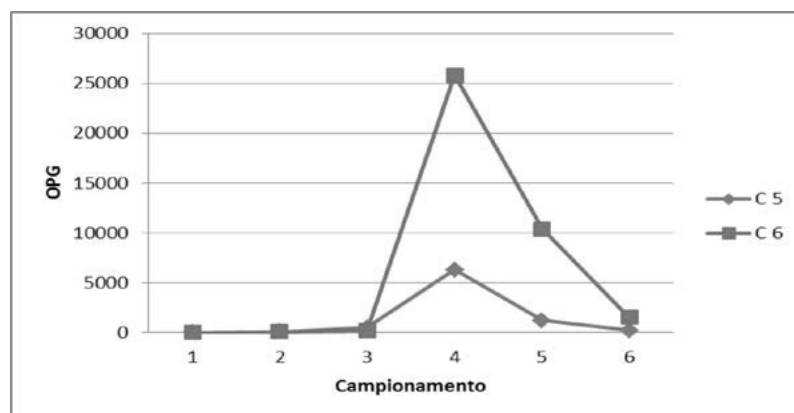


Figura 2. Andamento dell'emissione di oocisti nei gruppi C 5 e C 6.

Per quanto riguarda la valutazione delle *Lesion Score* effettuato a 35 gg di vita, non si registrano differenze statisticamente rilevanti tra i gruppi anche se i gruppi trattati (C1 e C5) hanno avuto meno lesioni e nel gruppo C 6, oltre ad avere 2 soggetti con score 1 per *E. acervulina*, si sono registrati casi di enterite non attribuibili ad infezioni da coccidi in 2 soggetti sui 5 controllati.

DISCUSSIONE

In questa sperimentazione si è indagato sulle capacità di un prodotto naturale ricco di polifenoli di controllare l'infezione da coccidi, in combinazione con i comuni sistemi di profilassi anticoccidici. Dalla bibliografia consultata infatti si era ipotizzato che il

prodotto, grazie all'elevata concentrazione in polifenoli, avrebbe aiutato gli animali a contrastare la coccidiosi coadiuvando l'anticoccidico presente nel mangime e migliorando anche la salute intestinale. Dai risultati ottenuti, le performances produttive non dimostrano alcuna differenza tra gli animali dei gruppi trattati e gli animali dei gruppi controllo; i pesi medi raggiunti nel corso dei 50 giorni di allevamento sono risultati simili tra i vari gruppi, e comunque non influenzati dal trattamento naturale, e i livelli di FCR nei quattro gruppi non risultano condizionati dall'assunzione del prodotto, tutte le performances registrate sono comunque in linea con quanto dichiarato nei manuali dell'ibrido allevato e quindi difficilmente migliorabili. Anche le percentuali di mortalità, durante la prima settimana del ciclo e totale, non hanno dimostrato differenze tra i capannoni, e comunque si sono mantenute nella norma delle percentuali osservate negli allevamenti di broilers. Come avvenuto nel nostro studio, anche Cao *et al.* (2005) non hanno ottenuto alcun miglioramento del peso e dell'efficienza alimentare di pulcini alimentati con estratti di foglie di tè verde, ma in questo caso la mortalità è stata drasticamente ridotta. In un ulteriore studio, invece l'assunzione di tè verde a livelli bassi di inclusione nella dieta, ha consentito un significativo aumento di peso dei broilers (Sarker *et al.*, 2010).

Lo scopo principale di questa ricerca, come detto in precedenza, si basa sulla valutazione dell'azione protettiva che questi estratti vegetali dovrebbero dimostrare verso il tratto gastrointestinale degli animali, ed in particolare nei confronti delle infezioni da coccidi. Nella nostra sperimentazione, essendo la prima svolta in condizioni di campo con un gran numero di soggetti (oltre 46.000), non si è volutamente modificata la metodica di controllo dei coccidi ma analizzando i dati relativi alla conta delle oocisti fecali, si può notare come nei gruppi di broilers a cui è stato somministrato il trattamento fitoterapico, l'emissione di oocisti sia notevolmente ridotta, rispetto ai gruppi a cui sono state somministrate solo molecole anticoccidiche. Infatti, analizzando per tipologia di capannone (C1 e C2) si può notare come la differenza tra il trattato (C 1) e il controllo (C 2) sia netta e confermata anche dall'analisi statistica già a partire dal controllo della 3^a settimana di vita, tale differenza si mantiene fino alla fine del ciclo. In questo caso si assiste ad un ritardo nel raggiungimento del picco di emissione nel trattato che viene raggiunto nel 35° giorno contro il 28° del C2. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che nelle prime settimane l'infezione è stata controllata efficacemente tanto da ritardarne l'emissione massima; va anche ricordato che l'ultima somministrazione del prodotto è stata fatta a 21 giorni e che a 30 giorni è stato sospeso l'anticoccidico. Un'altra spiegazione potrebbe essere data dal fatto che morfologicamente le oocisti riscontrate nelle prime settimane erano verosimilmente appartenenti alla specie *E. acervulina* mentre successivamente si è notato un aumento di *E. maxima*. Quest'ultima viene in parte inibita dalla prima e quindi ha infettato i polli più tardivamente quando non c'era più la copertura dell'anticoccidico (Mathis, 2005).

Nel C2 le OPG hanno raggiunto un valore di 50.000 che può venire considerato come livello di attenzione oltre il quale si può avere manifestazioni cliniche conclamate similmente a quanto avviene in infezioni sperimentali miste (Elmusharaf *et al.*, 2010). Per quanto riguarda i gruppi C5 e C6, anche in questo caso la differenza di OPG emesse è statisticamente favorevole al gruppo trattato. In questi gruppi i valori massimi raggiunti sono inferiori rispetto ai primi valutati in entrambi i gruppi ma, il picco massimo di emissione è stato sempre al 28° giorno di vita.

Questi dati sembrano confermare quanto già segnalato in bibliografia per quanto riguarda l'attività inibitoria degli estratti di tè verde nei confronti dei coccidi. Questa attività si esplica alterando la sporulazione delle oocisti eliminate nella lettiera inattivando gli enzimi responsabili della sporulazione del parassita con conseguente diminuzione della contaminazione ambientale (Jang *et al.*, 2007; Molan e Faraj, 2015). A conferma di quanto dimostrato con questo lavoro, un ulteriore studio conferma l'effetto anticoccidico di tè verde (*Camellia sinensis*) nei confronti dei coccidi appartenenti alla specie *Eimeria maxima*: i polli alimentati con tale sostanza per cinque settimane consecutive hanno riportato una significativa riduzione dell'emissione fecale di oocisti rispetto ai gruppi controllo, con conseguente diminuzione della contaminazione ambientale della lettiera. Come nel nostro studio, non è stato evidenziato alcun miglioramento dell'incremento di peso nei gruppi trattati (Jang *et al.*, 2007).

Confrontando invece i risultati della *lesion scoring* dei capannoni 5 e 6 (C5 e C6), si può osservare come il prodotto naturale abbia svolto l'azione desiderata, ovvero quella di proteggere il tratto gastrointestinale degli animali dagli stress indotti dai continui cambi di dieta e anche dalle infezioni da coccidi. Infatti, nessuno dei campioni del C5 (trattato) ha riportato lesioni macroscopiche a livello intestinale, indice di un effettivo beneficio del prodotto fitoterapico. La combinazione di estratti vegetali, in supplemento ai coccidiostatici chimici, mostra una miglior protezione nei confronti delle infezioni da *E. maxima* ed *E. acervulina*, riducendo oltre all'emissione di oocisti anche le lesioni riportate a livello del tratto intestinale dei broilers così come riscontrato anche da Almeida *et al.* (2014). In bibliografia viene dimostrata anche l'attività anticoccidica del melograno riferendosi alla sua capacità protettiva del tessuto del piccolo intestino dell'ospite da lesioni indotte da *Eimeria* spp. (Dkhil, 2013).

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni la ricerca in campo zootecnico si è orientata sempre più verso i prodotti naturali, derivati da estratti vegetali e oli essenziali, date le loro confermate capacità di migliorare la salute ed aumentare l'efficienza produttiva degli animali.

Tra i metaboliti secondari delle piante, sicuramente i polifenoli rappresentano la classe più importante, date le innumerevoli proprietà attribuite loro: dall'attività antiossidante a quella antinfiammatoria, dalla capacità anticancerogena a quella antivirale, ed infine la possibile azione nei confronti dell'infezione da coccidi.

Il nostro studio non ha la pretesa di dare delle indicazioni conclusive sul prodotto utilizzato ma sicuramente si può affermare che questo ha dimostrato l'effetto benefico di estratti di foglie di tè verde (*Camellia sinensis*) e buccia di melagrana (*Punica granatum*), prodotti vegetali particolarmente ricchi in polifenoli, in quanto nei gruppi di broilers trattati è stata riscontrata oltre ad una minor concentrazione di oocisti emesse, anche una minor incidenza di lesioni macroscopiche del tratto gastrointestinale. Grazie agli effetti positivi apportati dal prodotto naturale, gli animali che hanno ricevuto il trattamento hanno manifestato un miglioramento dello stato sanitario; infatti, in associazione con i farmaci coccidiostatici, il prodotto ha permesso agli animali di superare lo stress conseguente alle variazioni di dieta, le quali sono frequenti e veloci nell'allevamento del pollo da carne,

e quindi di minimizzare i danni subiti dall'infezione coccidica. E' importante sottolineare che questi additivi naturali non vogliono essere un'alternativa alle comuni cure antibiotiche in caso di patologia, ma rappresentano una strategia in termini di prevenzione della malattia, in associazione con le fondamentali norme di biosicurezza e con un'ottima qualità degli alimenti somministrati.

Ulteriori indagini sarebbero necessarie per capire meglio quali siano i principi attivi presenti nel prodotto e con quali meccanismi agiscono così come potrebbe essere interessante anche vedere se vi è un'azione antagonista anche in gruppi di broilers vaccinati contro i coccidi e se questo prodotto da solo è in grado di contrastare l'infezione coccidica in polli alimentati con mangimi senza coccidiostatici.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida G.F.D., Thamsborg S.M., Madeira A.M. (2014). The effects of combining *Artemisia annua* and *Curcuma longa* ethanolic extracts in broilers challenged with infective oocysts of *Eimeria acervulina* and *E. maxima*, *Parasitology*, vol. 141, n. 3, pp. 347–355.
2. Andremont, A. (2000). Consequences antibiotic therapy to the intestinal ecosystem. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 19:395-402.
3. Cao, B.H., Karasawa, Y., Guo, Y.M., (2005). Effects of green tea polyphenols and fructo-oligosaccharides in semi-purified diets on broilers' performance and caecal microflora and their metabolites. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18, 85–89.
4. Conway D.P., McKenzie M.E. (2007). *Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures*. Third Edition.
5. Dkhil A.M. (2013). Anti-coccidial, anthelmintic and antioxidant activities of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. *Parasitol. Res.* 112. pp. 2639–2646
6. Elmusharaf M.A., Mohamed H.E., Alhaidary A., Beyen C. (2010). Efficacy and characteristics of different method of Coccidiosis infection in broiler chickens. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 5 (1), pp. 45-51.
7. Hanson, J.R. (2003). *Natural Products the Secondary Metabolites*. The Royal Society of Chemistry, 1-27, Cambridge, UK.
8. Jang, S.I., Moo-Hyung, J., Hyun, S.L., Rami, A.D., Il-Keun, K., Suk, K. & Wongi, M. (2007). Anticoccidial effect of green tea-based diets against *Eimeria maxima*. *Veterinary Parasitology* 144, pp. 172–175.
9. Mathis G. (2005). Reasons for field problems with *E. maxima*: *E. acervulina* versus *E. maxima*. *Proceedings of the IXth International Coccidiosis Conference*, Foz do Iguassu.
10. Molan A.L., Faraj A.M. (2015). Effect of selenium-rich green tea extract on the course of sporulation of *Eimeria* oocysts. *Journal of Dental and Medical Sciences*, vol 14, n 4, pp. 68-75,
11. Sarker, M.S.K., Kim, G.M. & Yang, C.J., (2010). Effect of green tea and biotite on performance, meat quality and organ development in Ross broiler. *Egyptian Poultry Science Journal* 30(1), 77–88
12. Sørum H., Sunde M. (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet. Res.* 32. 227–241.

IDENTIFICAZIONE DI MARKER MOLECOLARI PER LA DIFFERENZIAZIONE DI UN VACCINO IBV GENOTIPO QX

Listorti V.¹, Laconi A.^{2,3}, Catelli E.¹, Cecchinato M.⁴, Lupini C.¹, Naylor C.J.²

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italia.

²Department of Infection Biology, Faculty of Health and Life Sciences, University of Liverpool, Leahurst Campus, CH64 7TE, Neston, United Kingdom.

³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 1, 3584CL, Utrecht, The Netherlands.

⁴Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD), Italia.

Summary

IBV genotype QX causes sufficient disease in Europe for several commercial companies to have started developing live attenuated vaccines. Here, one of those vaccines (L1148) was fully consensus sequenced alongside its progenitor field strain (1148-A) to determine vaccine markers, thereby enabling detection on farms. Twenty eight single nucleotide substitutions were associated with the 1148-A attenuation, of which any combination can identify vaccine L1148 in the field. Sixteen substitutions resulted in amino acid coding changes of which half were in spike. One change in the 1b gene altered the normally highly conserved final 5 nucleotides of the transcription regulatory sequence of the S gene, common to all IBV QX genes. No mutations can currently be associated with the attenuation process. Field vaccination strategies would greatly benefit by such comparative sequence data being mandatorily submitted to regulators prior to vaccine release following a successful registration process.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva aviaria (IBV) è diffuso in tutto il mondo e determina gravi perdite economiche nell'industria avicola. IBV colpisce principalmente il pollo, causando problemi respiratori, ed in alcuni casi, renali e riproduttivi (Jackwood and de Wit 2013). La malattia è controllata principalmente con l'uso di vaccini vivi attenuati. Durante il processo di attenuazione i vaccini vivi attenuati perdono la loro patogenicità, rimanendo tuttavia in grado di stimolare una risposta immunitaria protettiva nell'ospite (Bijlenga et al., 2004; Gelb et al., 1983). In campo circolano diversi genotipi di IBV e generalmente la vaccinazione con genotipo omologo determina un'ottima protezione.

Alcuni genotipi circolano per un periodo limitato di tempo (Jackwood 2012; de Wit et al., 2011), altri diventano endemici e richiedono la messa a punto di vaccini omologhi per il loro controllo. Il genotipo QX isolato per la prima volta in Cina e in seguito in Europa circa vent'anni fa (YuDong et al., 1998) e recentemente classificato come *lineage* GI-19 (Valastro et al., 2016), ha reso necessaria la produzione di vaccini omologhi.

La circolazione di ceppi vaccinali rende difficile stabilire l'effettiva prevalenza dei genotipi di IBV circolanti nelle diverse aree. Uno studio epidemiologico condotto

in Italia tra il 2012 e il 2014, ad esempio, ha dimostrato come, dopo la sospensione dell'impiego del vaccino 793B, non sia stato più possibile evidenziare questo genotipo di IBV in campo, supportando l'ipotesi che i ceppi circolanti fossero tutti di origine vaccinale (Franzo et al., 2014). Molte situazioni non sono così delineate ed un'indagine epidemiologica corretta può essere ostacolata dall'impossibilità di distinguere in maniera univoca tra i ceppi di campo ed i vaccini. L'impiego di tecniche molecolari ha reso questa differenziazione relativamente semplice, ma solo nel caso in cui ci sia possibilità di avere accesso ai ceppi progenitori da cui originano i vaccini. Il paragone tra le sequenze di un vaccino e del suo ceppo progenitore permette, infatti, di identificare i marker vaccinali, ovvero le mutazioni avvenute durante il processo di attenuazione, uniche di quello specifico vaccino.

Nel presente lavoro sono stati sequenziati per intero il genoma del ceppo vaccinale L1148 genotipo QX e del suo ceppo progenitore 1148-A. L'analisi delle mutazioni avvenute durante il processo di attenuazione ha portato all'identificazione dei marker vaccinali specifici, indispensabili per differenziare il ceppo vaccinale ed i ceppi di campo ed avere un quadro reale della circolazione del genotipo QX in campo.

MATERIALI E METODI

Estrazione dell'RNA virale, RT-PCR e sequenziamento

Sono state paragonate le sequenze del ceppo vaccinale commerciale QX-L1148 e del suo ceppo progenitore 1148-A, isolato su uova embrionate SPF.

L'RNA è stato estratto da entrambi i virus utilizzando il kit Qiamp viral RNA minikit (Quiagen, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. L'RNA è stato retro-trascritto utilizzando l'enzima Super Script III (Invitrogen, Carlsbad, USA) e successivamente amplificato utilizzando l'enzima Ranger (Bioline, London, UK). Per le reazioni sono stati seguiti i protocolli indicati dalle rispettive case produttrici. I primer utilizzati per la retro-trascrizione, l'amplificazione ed il sequenziamento erano stati precedentemente disegnati per il sequenziamento del genoma completo di IBV genotipo Q1 (Franzo et al., 2015). Primer specifici per il genotipo QX sono stati disegnati *ex novo* qualora necessario (tabella 1). Il sequenziamento è stato eseguito presso Source BioScience (Nottingham, UK). Sono state ottenute due sequenze per ciascuna regione analizzata. Nei punti in cui le sequenze del vaccino e del progenitore presentavano delle differenze, è stato ripetuto il sequenziamento partendo da una nuova retro-trascrizione, per confermare le differenze osservate.

RT-PCR della porzione 3' del genoma

La porzione 3' del genoma è stata sequenziata utilizzando un protocollo di 3'RACE precedentemente descritto (Laconi et al., 2016). L'RT è stata eseguita utilizzando un primer contenente 20 Timine (T) seguite da una sequenza *adaptor* nella sua porzione terminale 5'. Per la successiva amplificazione sono stati utilizzati 2 primer: il primer positivo disegnato su una sequenza localizzata all'interno del genoma, ed il negativo complementare alla sequenza dell'*adaptor*. Il prodotto di PCR è stato poi sequenziato utilizzando i primer complementari alla porzione amplificata, fino alla parte terminale del genoma costituita da una serie di ripetizioni del nucleotide Adenina (A) (tabella 1).

Analisi di sequenza

I cromatogrammi sono stati analizzati utilizzando il programma Crhomas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) e le sequenze allineate utilizzando Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). È stata poi fatta un'analisi predittiva delle *Open Reading Frames* (ORF) utilizzando il programma ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

Numeri di Accesso di GenBank

Le sequenze del ceppo vaccinale L1148 e del suo ceppo progenitore 1148-A sono state depositate nel database GenBank rispettivamente con i numeri di accesso KY933090 e KY933089.

RISULTATI

È stata ottenuta una sequenza consenso di 27.573 nt per entrambi i virus, mancante di circa 100 nt nella parte 5' UTR del genoma. L'analisi ha predetto la seguente organizzazione del genoma: 5'UTR-1a-1b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b-3'UTR, con 13 ORFs per entrambi i virus. Sono state determinate le sequenze regolatrici della trascrizione (TRS), composte da 8 nucleotidi ciascuna, ad esclusione di quella *leader* posta nell'estremità 5' del genoma (tabella 2). L'allineamento delle due sequenze ha mostrato un'identità del 99,8%. Tra la sequenza del ceppo progenitore e del vaccino sono state evidenziate 28 differenze nucleotidiche. In particolare, con riferimento alla sequenza del vaccino, sono state identificate undici mutazioni nucleotidiche nel gene 1a-1b, 8 nel gene S, 2 nella regione 5'UTR, 2 nella regione 5b e 2 nella regione 3'UTR, una mutazione nella regione E, una nella regione M ed una nella regione 5a (tabella 3). Delle 28 mutazioni nucleotidiche osservate, 8 sono silenziose, 4 localizzate in regioni non codificanti e 16 sono codificanti. Sette mutazioni amminoacidiche sono localizzate nel gene S, 5 nella regione 1a-1b, ed 1 ciascuna nelle regioni E, M e 5b. Alcune delle mutazioni codificanti osservate determinano dei cambiamenti amminoacidici in grado di condizionare la struttura e conseguentemente la funzionalità delle proteine. In particolare le mutazioni in posizione 20460 (Met-->His) e 21438 (Glu-->Gln) nella porzione S1 del gene S ed in posizione 25664 (Asp-->Tyr) nel gene 5b determinano un cambio di polarità dell'amminoacido codificato. La mutazione osservata in posizione 15693, nella regione 1b codificante per la proteina non strutturale Nsp13, determina la sostituzione di un amminoacido aromatico (Pro), con un amminoacido alifatico ed a minor ingombro sterico (Leu).

Nella TRS del gene S del vaccino è stata identificata una mutazione nella regione altamente conservata composta dai 5 nucleotidi finali (AACAA --> ACCAA)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il paragone della sequenza del vaccino L1148 con la sequenza del suo ceppo progenitore ha portato all'individuazione di marker vaccinali, utili per identificare il ceppo vaccinale in campo.

Il sequenziamento della porzione del genoma compresa tra le posizioni 21073 e 21438, contenente 4 marker vaccinali ravvicinati tra loro, può essere utilizzato come strumento per differenziare il vaccino. Tale porzione del genoma può essere retro-

trascritta, amplificata e sequenziata facilmente ed in maniera economica, utilizzando i primer riportati in questo lavoro.

L'importanza di mettere a disposizione della comunità scientifica le sequenze dei ceppi progenitori e dei vaccini, dovrebbe essere tenuta in considerazione dalle case farmaceutiche o dovrebbe essere resa obbligatoria dalle autorità competenti nel momento della registrazione dei vaccini. Differenziare i ceppi vaccinali e di campo è importante per programmare adeguatamente i piani vaccinali in base alla reale circolazione dei diversi genotipi in campo, per tenere sotto controllo la circolazione dei vaccini e per prevenire la scorretta attribuzione di focolai di campo a fenomeni di reversione a virulenza di ceppi vaccinali.

L'identificazione delle mutazioni tra i ceppi progenitori ed i vaccini potrebbe, inoltre, essere un punto di partenza importante per nuovi studi volti a determinare quali di queste siano responsabili dell'attenuazione dei ceppi progenitori e dei meccanismi coinvolti in tale processo. In questo studio sono state individuate 4 mutazioni importanti che potrebbero giocare un ruolo nell'attenuazione del ceppo vaccinale in esame. In letteratura è stato riportato che la patogenicità di IBV è legata alle caratteristiche della polimerasi e della proteina S. Le mutazioni da noi osservate nelle regioni codificanti per queste proteine (1a-1b ed S) potrebbero, quindi, avere un significato nell'attenuazione del ceppo progenitore (Armesto et al., 2009; Stevenson-Leggett et al., 2016). Anche la mutazione identificata nel TRS del gene S del vaccino, determinando una regolazione negativa della trascrizione del gene S (Bentley et al., 2013), può essere legata ad una diminuzione della patogenicità. La mutazione nel gene 5b potrebbe essere legata ad una modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. Infatti, è stato dimostrato che la proteina 5b è implicata nel meccanismo di inibizione della produzione di proteine da parte dell'ospite (Kint et al., 2016).

Per attribuire in maniera definitiva un significato a queste mutazioni, bisognerebbe introdurle singolarmente nel genoma, utilizzando tecniche di *reverse genetics*. e valutare le caratteristiche fenotipiche dei virus prodotti.

BIBLIOGRAFIA

1. Jackwood MW, de Wit S (2013). Infectious bronchitis. In: Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L., Nair V., (eds.), Diseases of Poultry 13th edition. Wiley-Blackwell pp. 139-159.
2. Bijlenga G, Cook JK, Gelb J Jr, and de Wit JJ (2004). Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathol.* 33: 550-557.
3. Gelb JJ and Cloud SS (1983). Effect of serial embryo passage of an Arkansas-type avian infectious bronchitis virus isolate on clinical response, virus recovery, and immunity. *Avian Dis.* 27: 679-687.
4. Jackwood MW (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56: 634-641.

5. de Wit JJ, Cook JK and van der Heijden HM (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol* 40: 223-235.
6. Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G and Monne I (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol.* 39: 349-364.
7. YuDong W, YongLin W, ZiChun Z, GenChe F, YiHai J and XiangE L (1998). Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine.* 13: 1-3.
8. Franzo G, Naylor CJ, Lupini C, Drigo M, Catelli E, Listorti V, Pesente P., Giovanardi D, Morandini E. and Cecchinato M. (2014). Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine.* 32:6765-6767.
9. Franzo G, Listorti V, Naylor CJ, Lupini C, Laconi A, Felice V, Drigo M., Catelli E. and Cecchinato M. (2015). Molecular investigation of a full-length genome of a Q1-like IBV strain isolated in Italy in 2013. *Virus Res.* 210: 77-80.
10. Laconi A, Clubbe J, Falchieri M, Lupini C, Cecchinato M, Catelli E, Listorti V. and Naylor C.J. (2016). A comparison of AMPV subtypes A and B full genomes, gene transcripts and proteins led to reverse-genetics systems rescuing both subtypes. *J Gen Virol.* 97:1324-1332.
11. Bentley K, Keep SM, Armesto M and Britton P. (2013). Identification of a noncanonically transcribed subgenomic mRNA of infectious bronchitis virus and other gammacoronaviruses. *J Virol.* 87: 2128-2136.
12. Kint J, Langereis MA, Maier HJ, Britton P, van Kuppeveld FJ, Koumans J, Wiegertjes G.F and Forlenza M. et al. (2016). Infectious Bronchitis Coronavirus Limits Interferon Production by Inducing a Host Shutoff That Requires Accessory Protein 5b. *J Virol.* 90:7519-7528.
13. Armesto M, Cavanagh D, Britton P. (2009). The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLoS One.* 4: e7384.
14. Stevenson-Leggett P, Britton P and Bickerton E (2016). Generation of a recombinant infectious bronchitis virus suggests that the S protein is a determinant of pathogenicity. Proceedings of the 9th International symposium on avian coronavirus and pneumovirus, Utrecht, The Netherlands, 21-24 June, 2016 4th annual meeting of the COST action FA1207 on controlling avian coronaviruses, p.122.

Tabella 1: Primer utilizzati per le RT, le PCR e il sequenziamento dell'intero genoma dei ceppi di IBV L1148 e 1148-A.

RT	Sequence 5'-3'	Sequencing	Sequence 5'-3'
2,06-	ttagtaaaaagaccacc	0,67+	cctaaggattacgctgatgctttg
4,26-	catactttgcgcatc	1,26+	ttcgcaggaactgtctgcaagc
6,18-	agaaaacctacaccag	2,52+	tagaggaaatgcacagcttggtgc
8,18-	gtaaagaatgtactaacc	3,04+	tacaccaatgtcacagcttggtgc
QX10,20-	cacagttgtgtcactaactcaag	3,1+	ctctcgatgttgtaattaccatctgg
12,1-	ctccataagaatcctg	4,8+	tgattgtgatgttgtaattaccatctgg
14,13-	taaaacttggtgttcc	5,32+	ctattagtcttagggcaatatggg
QX16,15-	ggtcaacatactaacctcatctacc	6,53+	gttaaacctacagcatatgcttacc
QX18,10-	catagaagaagaatggcatagctttc	7,17+	aatgctcctccgtagtatggaag
19,73-	caaaatgcattactcgc	QX 8,50 +	gtgtatacatgtacacaccgctg
22,51-	catatctcttttgacc	9,26+	cctgtcactatgcttcaatggtag
QX24,20-	ctactcacctgttcaattgtttctc	QX 9,40 -	ctaattatcgggtgaactttctgagc
26,23-	accaactttaggtggc	10,6+	ggtaaatccacctaactgtgtggg
27,89-	ttgctctaactctatac	QX10,90-	cagccaagtctctcaagattgac
Dta-Adaptneg	gcatctcgaggctgtggcttttttttttt ttttttta	QX11,50+	gaagcaggcaatcaatttatgtgac
Dtc-Adaptneg	gcatctcgaggctgtggcttttttttttt tttttttc	11,13+	gaagtagatagcatggagagacg
Dtg-Adaptneg	gcatctcgaggctgtggcttttttttttt tttttttg	12,64+	gacttaaagtcagaagtaacagctg
		13,18+	gatctcctcaagtatgattatactgagg
PCR	Sequence 5'-3'	14,69+	caaggctctgtagcagatattctgg
0,06+	gcgctagattccaacttaacaaaacg	15,25+	aagtgtgctatgacatgcatgc
2,03-	gacttgcgaacaagatgccaatgcc	16,09-	cacataaagcatcaacagctgcatgag
1,92+	tgaggcttgcataatgaaaagtgcg	15,99+	ggcaagcagaagcgctactacagta
4,2-	ggtataaagaggatttcttatcctcaa- gatcatg	16,62+	catgaaagtggctcagcctacaac
4,1+	cggaggatgggttaataaccgc	QX16,80-	gaatcagctgtaacacagaatatac

6,08-	caaataatattagaagaccaaataaagc- caattcc	17,18+	caacatgtttataacacgtgatgaggc
5,93+	gattctttgatgtgttacgctattgtgcag	18,18+	taacctacctgggtgaatgggtg
8,05-	cctggtttagtatactcacatactacc	18,71+	gaagagaaatattcgacactgcc
QX7,80+	cttccatagcattgtttgctctag	19,86+	tgacatgtttctgttcttccagattg
10,02+	cagtattattggagttgtgctgaag	QX19,50+	agtagccaatgatggcaatgacgatg
12,08-	gaatcctgatccggagttggacttggc	QX19,90+	gcttcagtcggcttgacatgtgg
12,01+	gtggcagcaggtaacaccttagg	19,97+	gatagccaataatggcaatgatgacg
14,12-	ataaaactgtgtttccaataactacagg	QX20,60+	ctgcacatgagtgcactgttgggtg
QX13,90+	gaggtgacgtctaaatatttgaatg	QX21,70-	caaaattcgtcttaattcacctg
QX16,15-	ggtcaacatactaacctcatctacc	22,48+	ccatttctagtaattgtagcactgg
QX15,06+	gatgattgcactcgcatagtacctc	22,99+	ctctagcattacaacaaattcaa- gatgttg
QX18,10-	catagaagaagaatggcatagctttc	24,60+	ctgtgtctttttctgatacatgggtag
17,94+	cggtgtctatgatataggcaaccctaaagg	25,27+	gacgtaatactatcgtatgggtcag
19,67-	gtattgacagagtgtgtactttgcc	QX25,87+	ctcaattaagggttttagataggttaattc
QX18,10-	catagaagaagaatggcatagctttc	QX26,88-	gacatgtaggtaatacaactacatgcc
19,46+	gtaacagtgtcaattgattaccatagc	QX27,20+	cctacatgtctatcgccaggg
22,26-	tccatacgcgttgtatgtactcatctg	QX21,70-	caaaattcgtcttaattcacctg
QX21,90+	ggtaaatcctgtgaagatgtaataaac	22,48+	ccatttctagtaattgtagcactgg
QX24,20-	ctactcacctgttcaattgtttctc	22,99+	ctctagcattacaacaaattcaa- gatgttg
23,99+	cattatgcctcaatgagtaagtgtgg	24,60+	ctgtgtctttttctgatacatgggtag
26,22-	aacttaggtggctttgctctcc	25,27+	gacgtaatactatcgtatgggtcag
26,02+	gaaaagcgcgaattatctgagagaagg	QX25,87+	ctcaattaagggttttagataggttaattc
27,83-	catagccaattaaacttaactaaac- taaaatttagctc	QX26,88-	gacatgtaggtaatacaactacatgcc
26,49+	gatagccaagatggtatagtgtggg	QX27,20+	cctacatgtctatcgccaggg
Adapt neg	gcatctcgagggtgtggtgc		

Tabella 2: Sequenze dei TRS del ceppo progenitore 1148-A e del ceppo vaccinale L1148. E' evidenziata la mutazione osservata nel TRS del gene S del ceppo vaccinale.

Gene	posizione nucleotidica di inizio del TRS	TRS progenitore	TRS vaccino
S	20208	AGG AACAA	AGG ACCAA
3	23740	CTGAACAA	CTG AACAA
M	24326	CTT AACAA	CTTAACAA
4b	24800	CTG AACAA	CTG AACAA
5	25390	ACC AACAA	ACCAACAA
N	25740	CTT AACAA	CTT AACAA
6b	26901	CAA AACAA	CAA AACAA

Tabella 3: Differenze nucleotidiche ed amminoacidiche osservate tra il ceppo progenitore 1148-A ed il ceppo vaccinale L1148, in grigio sono evidenziate le mutazioni amminoacidiche

Regione del Genoma	Posizione nel genoma	Nucleotide		Amminoacido	
		progenitore	vaccino	progenitore	vaccino
5'UTR	78	C	T	n.c.	n.c.
5'UTR	257	C	T	n.c.	n.c.
Nsp 2	548	C	T	N	N
Nsp 2	1970	C	T	F	F
Nsp 3	3322	C	T	T	I
Nsp 3	4597	T	G	I	S
Nsp 3	6209	C	T	C	C
Nsp 4	8688	G	A	N	N
Nsp 8	10929	C	A	L	I
Nsp 12	14440	C	T	V	V
Nsp 13	15693	C	T	P	L
Nsp 14	17239	C	T	N	N
Nsp 16	20212	A	C	E	D
S1	20460	G	C	M	H
S1	20521	C	A	D	K
S1	21073	C	T	T	I
S1	21435	G	T	G	F
S1	21436	G	T	G	F
S1	21438	G	C	E	Q
S2	22902	T	A	S	T
S2	22921	C	T	S	L
E	24281	G	T	A	S
M	25048	A	C	E	A
5a	25616	C	T	Y	Y
5b	25664	G	T	D	Y
5b	25831	C	T	N	N
3'UTR	27074	C	T	n.c.	n.c.
3'UTR	27539	T	C	n.c.	n.c.

n.c.: non codificante

ADENOVIRUS DI TIPO II IN FARAONE CON SPLENITE ED ENTERITE EMORRAGICA. CASO CLINICO

Mainenti M.¹, Dall'Angelo A.², Zanardello C.¹, Moronato M.L.¹, Catania S.¹, Terregino C.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD)

² Società Cooperativa Agricola San Martino SCARL - Via Sommacampagna 63/H, 37137, Verona (VR)

Summary

Avian Adenoviruses type II, belonging to the genus *Siadenovirus*, can cause severe diseases in poultry with different clinical and pathological manifestations among species (hemorrhagic enteritis in turkeys, marble spleen disease in pheasants and splenomegaly in chickens). Guinea fowls have been reported to be susceptible to Adenovirus type II infection and also in Italy outbreaks were reported in the early 90ies. In this paper, we report a recent case occurred in Veneto region in 52-day-old commercial guinea fowls with sudden increase in mortality, splenitis and hemorrhagic enteritis. Diagnostic tools available for turkey hemorrhagic enteritis virus (rRT-PCR and ELISA) were used and resulted positive, as well as an adenovirus different from FAdV was successfully isolated from spleen samples in CEL cells. Further studies aimed to genetically characterize the virus and understand the source of infection are ongoing.

INTRODUZIONE

All'interno del gruppo Adenovirus di tipo II o genere *Siadenovirus* vengono classificati virus aviari sierologicamente e genotipicamente molto simili tra loro che possono causare gravi patologie nel tacchino, fagiano e pollo, con manifestazioni cliniche e patologiche differenti a seconda della specie colpita (enterite emorragica del tacchino, *marble spleen disease* del fagiano, splenomegalia del pollo). A partire dagli anni '80 sono stati riportati alcuni casi di infezione naturale nella specie faraona (*Numida meleagris*) con lesioni macroscopiche ed istopatologiche in comune con la *marble spleen disease* (MSD) del fagiano e la splenomegalia del pollo, riprodotte in condizioni sperimentali mediante l'inoculo sia del virus del tacchino che quello del fagiano. In particolare in Italia, tali lesioni sono state riscontrate in diversi casi nei primi anni '90, in cui è stato inoltre evidenziato un *Adenovirus* in microscopia elettronica da milza e sieroconversione all'AGID test diretto all'antigene del virus dell'enterite emorragica del tacchino. Nonostante questi dati, la presenza di questa malattia nella faraona e la natura dell'infezione sono ancora poco conosciute, inoltre non vi sono dati sulla possibile applicazione di metodiche diagnostiche rapide e sensibili recentemente sviluppate per le altre specie. Pertanto lo scopo del presente lavoro è quello di descrivere un caso di infezione di campo recentemente diagnosticato in un allevamento commerciale di faraone in Veneto (marzo 2017), caratterizzato dalla co-presenza di splenite ed enterite emorragica e in cui sono state applicate metodiche diagnostiche recentemente implementate per il virus dell'enterite emorragica del tacchino, quali *real time* RT-PCR (rRT-PCR) e ELISA.



MATERIALI E METODI

Nel mese di marzo del 2017, sono state consegnate all'IZSVe 5 carcasse di faraone femmine di 52 giorni di età provenienti da un allevamento commerciale di 12.000 faraone in Veneto, che aveva registrato negli ultimi 4-5 giorni una mortalità anomala di circa 20 soggetti al giorno in assenza di sintomatologia clinica. Gli animali erano stati vaccinati per Pseudopeste ad inizio ciclo e non avevano ricevuto trattamenti farmacologici. Ai fini diagnostici è stato eseguito l'esame anatomo-patologico su tutti i soggetti, parassitologico da gozzo e intestino, batteriologico da fegato e intestino, ricerca di sostanze inibenti, ricerca di *Campylobacter spp.*, esame istologico da milza, intestino, fegato, rene e pancreas, esame di microscopia elettronica da pancreas, rRT-PCR per il virus dell'enterite emorragica del tacchino e PCR per *Fowl Adenovirus* (FAdV) da pool di organi, rRT-PCR per influenza aviaria da tamponi tracheali e cloacali. Successivamente alla diagnosi, sono stati eseguiti ulteriori esami a scopo di approfondimento su 10 soggetti a 60 giorni di età e 10 campioni di sangue, tra cui ricerca anticorpi per il virus dell'enterite emorragica del tacchino con tecnica ELISA, isolamento virale da milza su uova embrionate e colture cellulari primarie di epatociti di embrione di polli SPF (CEL), esame in microscopia elettronica su milza, rRT-PCR per il virus dell'enterite emorragica del tacchino (HEV) su milza, esame istologico di organi aggiuntivi quali cuore, tonsille ciecali, muscolo pettorale, trachea, cervello, borsa di Fabrizio, timo, stomaco muscolare e stomaco ghiandolare.

RISULTATI

All'esame anatomo-patologico dei soggetti di 52 giorni di età si sono osservate alcune delle lesioni precedentemente descritte da Massi *et al.* (1995) quali emorragie petecchiali disseminate da lievi a gravi a carico della muscolatura dei muscoli pettorali, della coscia e delle sierose della cavità celomatica, moderata epatomegalia con grave congestione dell'organo, milza con aspetto pallido e variegato in tutti i soggetti. Inoltre erano presenti lieve splenomegalia, enterite a contenuto emorragico di un tratto focale del duodeno-digiuno, ascite e versamento pericardico in 2 soggetti, e pallore renale e del parenchima pancreatico in tutti i soggetti. Nei soggetti di 60 giorni di età si sono riscontrate le medesime lesioni macroscopiche sopradescritte, con minor gravità del quadro emorragico a livello muscolare e presenza in 1 soggetto di polisierosite fibrinosa. L'esame istopatologico ha permesso di evidenziare a sede splenica i caratteristici corpi inclusi intranucleari anfolilici a carico di alcune cellule linfocitarie e macrofagiche associati a un grave processo necrotico-emorragico. A sede intestinale si sono osservati necrosi della mucosa ed infiltrazione linfoplasmocitaria della lamina propria. Fegato e rene presentavano focolai multipli necrotico-emorragici ed i muscoli scheletrico e cardiaco multifocale congestione ed emorragie. L'esame in microscopia elettronica ha rilevato la presenza di particelle virali riferibili ad *Adenoviridae* in pancreas, milza e pool di organi. La diagnosi di Adenovirus di tipo II è stata confermata dalla positività alla rRT-PCR per HEV su milza e pool di organi e dalla positività sierologica alla metodica ELISA. Inoltre l'isolato da CEL è stato identificato come adenovirus in microscopia elettronica ed è risultato positivo alla rRT-PCR per HEV e negativo alla PCR per FAdV.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente lavoro descrive un caso recente di infezione naturale di *Adenovirus* di tipo II in un allevamento commerciale di faraone di 52 giorni di età in Veneto. Rispetto alle infezioni naturali riportate in precedenza, nel presente caso non si è evidenziata alcuna sintomatologia clinica ma solamente un aumento della mortalità, anomalo per soggetti di questa età. In accordo con i casi riportati in Italia precedentemente da Massi e colleghi (1995), il quadro macroscopico preponderante era di tipo emorragico in particolare con gravi petecchie diffuse a carico dei muscoli scheletrici e delle sierose. In aggiunta a queste erano presenti lesioni simili a quelle presenti nelle infezioni da *Adenovirus* di tipo II nel tacchino e nel fagiano, quali enterite emorragica a carico del duodeno e digiuno, e splenomegalia con aspetto variegato del parenchima rispettivamente. Le metodiche di laboratorio per il virus dell'enterite emorragica del tacchino (rRT-PCR ed ELISA) utilizzate direttamente sugli organi con lesioni hanno dato esito positivo confermando un *Adenovirus* di tipo II come causa dell'infezione, e dimostrando la loro applicabilità nella diagnosi di questo tipo di virus anche nella specie faraona. È interessante notare come la faraona sia una specie recettiva a diversi altri patogeni del tacchino, come ad esempio alcuni ceppi di *Astrovirus* e *Mycoplasma meleagridis*, nonostante sia una specie distante dal tacchino sia dal punto di vista filogenetico che di areale geografico. Sorprendente è stato l'isolamento di questo virus in CEL sulle quali notoriamente i *Siadenovirus*, a cui appartengono i virus dell'HEV e dell'MSD, non crescono. Sono dunque necessari ulteriori approfondimenti sulle caratteristiche biologiche e genetiche del virus isolato per poterne valutare l'origine e le similitudini con virus responsabili di patologie simili in altre specie.

BIBLIOGRAFIA

- Capua I, Gough RE, Scaramozzino P, Lelli R, Gatti A. 1994. Isolation of an adenovirus from an ostrich (*Struthio camelus*) causing pancreatitis in experimentally infected guinea fowl (*Numida meleagris*). *Avian Dis.* 38(3):642-6.
- Catania S, Rodio S, Moronato ML, Ayling RD, Nicholas RAJ. 2014. Outbreak of disease associated with *Mycoplasma meleagridis* in a free-range mixed poultry farm. *Veterinary Record Case Reports* 2: e000107. doi: 10.1136/vetrecr-2014-000107
- Charlton BR, Bickford AA. 1995. Gross and histologic lesions of adenovirus group I in guinea fowl. *J Vet Diagn Invest.* 7(4):552-4.
- Cowen BS, Rothenbacher H, Schwartz LD, Braune MO, Owen RL. 1988. A case of acute pulmonary edema, splenomegaly, and ascites in guinea fowl. *Avian Dis.* 32(1):151-6.
- Eregae ME, Vaillancourt JP, Brugère-Picoux J. 2015. Siadenovirus (Hemorrhagic enteritis). In: *Manual of Poultry Diseases*, ed. Brugère-Picoux J, Association française pour l'avancement des sciences, Toppan Printing Leefung, China, pp. 184-185.
- Massi P, Gelmetti D, Sironi G, Lavazza A, Dottori M, Pascucci S. 1993. Malattia emorragica della gallina faraona. *Segnalazioni in Italia. Zootecnica Internazionale*, 4 (suppl.), 75-76.
- Massi P, Gelmetti D, Sironi G, Dottori M, Lavazza A, Pascucci S. 1995. Adenovirus-associated haemorrhagic disease in guinea fowl. *Avian Pathol.* 24(2):227-37.

Ojkić D1, Krell PJ, Tuboly T, Nagy E. 2008. Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada. *Can J Vet Res.* 72(3):236-41.

Reece RL, Pass DA. 1986. Inclusion body pancreatitis in guinea fowl (*Numida meleagris*). *Aust Vet J.* 63(1):26-7.

Toffan A, Catania S, Salviato A, De Battisti C, Vascellari M, Toson M, Capua I, Cattoli G. 2012. Experimental infection of poults and guinea fowl with genetically distinct avian astroviruses. *Avian Pathol.* 41(5):429-35.

Zellen GK, Key DW, Jack SW. 1989. Adenoviral pancreatitis in guinea fowl (*Numida meleagris*). *Avian Dis.* 33(3):586-9.

COMPARAZIONE DELL'EFFICACIA PROTETTIVA DI UN PROTOCOLLO VACCINALE TRADIZIONALE PER NDV RISPETTO AD UNA SINGOLA SOMMINISTRAZIONE DI UN VACCINO RICOMBINANTE HVT-NDV IN TACCHINI DA CARNE A FINE CICLO

Mazzetto E.¹, Bonfante F.¹, Salomoni A.¹, Boscolo L.¹, Maniero S.¹, Meini A.², Berto G.², Terregino C.¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*; ² *Ceva Salute Animale S.p.A.*

Summary

Newcastle disease (ND) is one of the most important poultry diseases, and it causes significant economic losses to the poultry industry. In many countries, prophylactic vaccination is applied to prevent and reduce the circulation of Newcastle disease virus (NDV). However, despite the extensive active immunization with inactivated and/or live attenuated vaccines, outbreaks have been reported in many parts of the world. To overcome some of the limitations associated with current vaccination approaches, new recombinant ND vaccines have been developed.

Among these, the Turkey Herpesvirus (HVT) vector has been recently engineered to express the NDV fusion protein. This novel vaccine appears to have uniquely advantageous characteristics, such as the abilities to elicit strong cell-mediated immunity along with humoral immunity, to be less affected by maternally derived antibodies and to replicate for months inside the host upon a single administration, constantly boosting the immune response.

In this study, the efficacy of a single shot of a commercial HVT-ND vaccine at the hatchery is compared with a traditional immunization program for ND in meat turkeys that consist of a live vaccine administered by drinking water within the first week and a shot with an inactivated vaccine at about 25 days of age. Irrespective of the immunization protocol, female and male turkeys at the end of their commercial life were fully clinically protected against a velogenic NDV strain. The overall equivalence between the protective performances of the HVT-ND and the traditional ND vaccination indicate this vaccine as a promising alternative for the protection of meat turkeys up to the end of their productive cycle.

INTRODUZIONE

La malattia di Newcastle (ND) è una tra le patologie virali più diffuse al mondo e l'entità dei danni che può provocare in termini di perdite economiche nella filiera avicola è comparabile a quella di malattie quali l'influenza aviaria e la bronchite infettiva (Kapczynski et al., 2013). In Italia la vaccinazione profilattica è divenuta obbligatoria a seguito dell'epidemia di NDV nel 2000 (Capua, et al., 2002), e successivamente il Ministero della Salute con nota 0005266-03/03/2015-DGSAF ha rinnovato la gestione del piano vaccinale definendo l'utilizzo di vaccini vivi attenuati, inattivati o combinazioni di essi in funzione della specie e della tipologia produttiva. Questi schemi di vaccinazione presentano tuttavia alcune criticità; la modalità di somministrazione e l'interferenza degli anticorpi materni, per esempio, sono fattori che spesso ne compromettono l'efficacia. Inoltre, mentre da una parte i vaccini vivi per ND possono, in alcuni contesti, favorire l'insorgenza di forme respiratorie;

dall'altra i vaccini spenti comportano non solo un significativo aumento dei costi legati alla manodopera, soprattutto in animali di grandi dimensioni come il tacchino da carne, ma anche un incremento del rischio di introduzione in azienda di altri patogeni tramite il personale delle squadre di vaccinazione.

Le nuove tecnologie in campo farmaceutico hanno messo a disposizione un vaccino ricombinante che utilizza l'Herpesvirus dei tacchini (HVT) come vettore per l'espressione del gene della proteina di fusione (F) dell'NDV (Palya et al., 2012). Tale vaccino sfrutta la capacità dell'HVT di replicare nei linfociti e di persistere all'interno dell'ospite determinando così un costante stimolo antigenico a seguito di una unica somministrazione (Palya et al., 2014). Inoltre, grazie a questo meccanismo, il vaccino HVT-ND conferisce un'immunità di tipo cellulo-mediata oltre che umorale (Esaki et al., 2013).

In questo studio abbiamo valutato in tacchini da carne a fine ciclo l'efficacia protettiva della vaccinazione con l'HVT-ND rispetto ad un protocollo vaccinale per ND comunemente utilizzato in campo. Due gruppi di tacchini, maschi e femmine, sono stati suddivisi a seconda della vaccinazione ricevuta nelle rispettive aziende, ovvero secondo schema tradizionale o con HVT-ND, e successivamente infettati con una dose letale di un ceppo velogeno di NDV.

MATERIALI E METODI

Animali, protocolli vaccinali, virus e disegno sperimentale.

Gli animali utilizzati ai fini della sperimentazione sono stati tacchini da carne femmine e maschi, forniti da due aziende distinte tra loro per localizzazione e tipologia di programma vaccinale applicato. Un'azienda ha applicato uno schema vaccinale comunemente utilizzato in campo basato su una somministrazione di un vaccino vivo con acqua da bere a 5 giorni di vita, seguita da un richiamo con vaccino inattivato per via sottocutanea a 26 giorni di età. Tale protocollo è indicato in questo studio come schema di vaccinazione tradizionale (vacTRAD). L'altra azienda ha utilizzato un vaccino ricombinate HVT per NDV (Vectormune® HVT NDV, Ceva, France), tramite un'unica somministrazione per via sottocutanea subito dopo la schiusa. Questo protocollo è indicato nel testo come HVT. I tacchini di entrambe le aziende sono stati prelevati al termine dei rispettivi cicli produttivi, all'età di 100 giorni per le femmine e 145 giorni per i maschi, trasferiti negli stabulari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) ed accasati in isolatori a pressione negativa con filtri HEPA. Ogni azienda ha fornito 10 femmine e 8 maschi, per un totale di 20 e 16 soggetti per genere. Un gruppo di 7 tacchini di 6 settimane, non vaccinati per NDV è stato utilizzato come controllo per il challenge. Trascorso il tempo necessario all'adattamento in isolatore, i tacchini sono stati sottoposti ad un primo prelievo di sangue per la quantificazione del titolo anticorpale contro NDV nel periodo immediatamente precedente l'infezione; successivamente tutti gli animali sono stati infettati tramite somministrazione oculo-nasale di 200 µl di liquido allantoideo a una dose di 10^7 EID₅₀. Il virus utilizzato per il challenge è il ceppo velogeno (vNDV) Hertz 33/56 (di seguito indicato come Hertz). I gruppi sono stati monitorati quotidianamente per una valutazione clinica, mentre la raccolta dei tamponi tracheali e cloacali è avvenuta a 2, 4 e 7 giorni post-infezione (p.i.). A 21 giorni p.i. è stato eseguito un secondo prelievo di sangue ai fini di valutare l'incremento del titolo anticorpale. La sperimentazione è stata condotta in ottemperanza con

quanto previsto dal D.Lgs 26/2014 e dalle linee guida nazionali ed internazionali sul benessere animale, previo parere favorevole del comitato etico dell'IZSVe.

Sierologia

Il test di inibizione dell'emoagglutinazione è stato eseguito utilizzando il virus di challenge secondo le procedure ufficiali del manuale OIE (Edition, 2012). I sieri sono stati inoltre testati con metodica ELISA tramite il kit commerciale ID Screen® Newcastle Disease Indirect-IDvet. I titoli anticorpali dei sieri testati con il kit ELISA sono stati estrapolati utilizzando un software fornito dalla ditta IDvet.

Virologia

I tamponi sono stati processati per effettuare l'estrazione dell'RNA virale con il kit Mag MAX™-96 AI/ND. Gli estratti sono stati quantificati come copie genomiche virali attraverso una rRT-PCR quantitativa (qrRT-PCR) per il gene L di NDV. Per la quantificazione è stata generata una curva standard utilizzando diluizioni seriali di RNA virale sintetico espresse in copie genomiche/µl. Il trascritto del RNA sintetico è stato ottenuto in vitro con il kit MEGAscript T7 transcription Kit (Ambion®, Austin, TX, USA), utilizzando come modello genomico il ceppo Hertz di NDV.

Analisi statistica

Nell'analisi statistica si è tenuto conto della natura non indipendente dei dati e dell'impossibilità di definirne una distribuzione normale a causa della numerosità campionaria. Per il confronto si è quindi utilizzato il test di Wilcoxon-Mann-Whitney, un test non parametrico per campioni appaiati. Qualora sottogruppi di dati di interesse siano risultati seguire una distribuzione normale e/o rispettare i postulati di omoschedasticità, test parametrici quali ANOVA e *t-student* sono stati applicati per il loro confronto. Per tutte le analisi il livello di significatività statistica è stato fissato a 0.05 (*p-value* <0.05).

RISULTATI

Gruppo controllo

L'infezione dei tacchini del gruppo controllo ha causato il 100% di mortalità entro 7 giorni p.i. Durante il decorso della malattia sono stati osservati sintomi riconducibili a ND, quali ottundimento del sensorio, dispnea, diarrea verdastra e una grave sintomatologia nervosa costituita da tremori, difficoltà nella deglutizione e perdita di equilibrio e stereotipie motorie.

Tacchini: femmine

Al prelievo precedente l'infezione, i titoli anticorpali medi delle femmine a 100 giorni di età del gruppo vacTRAD sono risultati maggiori rispetto al gruppo HVT (Tab.1). Sia gli animali del gruppo vacTRAD sia del gruppo HVT hanno superato il challenge senza manifestare sintomatologia. Nel gruppo vacTRAD tutti i tamponi sono risultati negativi alla qrRT-PCR, mentre nel gruppo HVT sono state rilevate positività genomiche nei tamponi tracheali di due animali a 4 giorni p.i., e nel tampone tracheale di uno di questi animali a 7 giorni p.i. L'esito negativo delle prove di isolamento in uova embrionate ha indicato la non infettività dei campioni positivi in qrRT-PCR. Ciascuna delle metodiche sierologiche utilizzate ha evidenziato in entrambi i gruppi un rialzo significativo dei titoli anticorpali p.i. (Fig.1a; Tab.1).

Tacchini: maschi

I titoli anticorpali medi rilevati prima del challenge sono risultati maggiori nel gruppo vacTRAD rispetto al gruppo HVT (Tab.2).

Nessun segno clinico riconducibile a NDV è stato riscontrato lungo la durata della prova. Tutti i campioni virologici sono risultati negativi alla qrRT-PCR. In entrambi i gruppi, le metodiche sierologiche non hanno rivelato alcun aumento significativo dei titoli anticorpali in seguito all'infezione; al contrario si è evidenziato un calo statisticamente significativo dei titoli anticorpali del gruppo vacTRAD (Fig.1b).

Il confronto dei titoli anticorpali pre-infezione dei maschi e delle femmine ha evidenziato come i maschi, a parità di protocollo vaccinale presentavano valori più alti rispetto a quelli delle femmine, con significatività maggiore negli animali dei gruppi HVT (Fig. 2a). La stessa tipologia di confronto è stata utilizzata per comparare la variabilità dei titoli anticorpali pre-infezione: la deviazione standard tra maschi e femmine è risultata significativamente differente soltanto negli animali vaccinati tradizionalmente (Fig.2b), indicando una maggiore omogeneità nel titolo anticorpale dei soggetti maschi a fine ciclo rispetto alle femmine.

DISCUSSIONE

Il vaccino ricombinante HVT-ND, al pari del protocollo vaccinale tradizionale, ha protetto clinicamente entrambi i gruppi dal challenge. Nelle femmine la vaccinazione non ha comportato una totale refrattarietà all'infezione in quanto si è registrato un rialzo dei titoli nel 70 e 80% dei soggetti, rispettivamente per il gruppo vacTRAD e quello HVT. Questo dato ha trovato conferma nella positività al genoma virale rilevata nei tamponi di due animali del gruppo HVT.

Nei gruppi di maschi, oltre ad una completa protezione clinica, si è osservata una protezione vaccinale in grado di neutralizzare la replicazione virale, in quanto tutti i tamponi sono risultati negativi e non è stato registrato incremento dei titoli anticorpali in alcun soggetto. La performance migliore registrata nei gruppi di maschi rispetto alle femmine risulta coerente con i maggiori titoli anticorpali rilevati precedentemente al challenge virale a prescindere dal protocollo vaccinale adottato, infatti, i titoli anticorpali medi delle femmine sono risultati sempre inferiori a quelli dei maschi e nel caso delle femmine del gruppo vacTRAD anche più disomogenei.

CONCLUSIONE

Questo è il primo studio di challenge di un vaccino ricombinante HVT-ND in tacchini da carne a fine ciclo. La somministrazione di una singola dose al primo giorno di vita ha protetto i tacchini da malattia clinica al pari della vaccinazione tradizionale. Nei tacchini maschi il vaccino HVT ha indotto un'immunità sterilizzante verso un'infezione da virus altamente patogeno, mentre nelle femmine la replicazione virale è stata fortemente ridotta, risultando solo nell'eliminazione di materiale genetico virale non infettante in un numero ridotto di animali. La sostanziale equivalenza dell'efficacia protettiva dei protocolli vaccinali testati, indica il vaccino HVT-ND come un presidio immunizzante alternativo o complementare alle somministrazioni di vaccini vivi tradizionali attenuati ed inattivati attualmente adottate negli allevamenti di tacchini.

Tab.1 Esami sierologici nelle femmine: titolo anticorpale medio per gruppo vaccinale nel pre e nel post-infezione e tasso di sieroconversione.

	Titolo anticorpale in ELISA		Titolo anticorpale in HI (log2)		Sieroconversione (>2log2)
	Pre-infezione	Post-infezione	Pre-infezione	Post-infezione	N°animali/tot
Vaccinati tradizionalmente	9283,28	15117,86	4,3	6,8	7/10
Vaccinati HVT-NDV	5851,51	13818,01	2,7	5,2	8/10

Tab.2 Esami sierologici nei maschi: titolo anticorpale medio per gruppo vaccinale nel pre e nel post-infezione e tasso di sieroconversione.

	Titolo anticorpale in ELISA		Titolo anticorpale in HI (log2)		Sieroconversione (>2log2)
	Pre-infezione	Post-infezione	Pre-infezione	Post-infezione	N°animali/tot
Vaccinati tradizionalmente	17459,37	16264,23	8,8	7,7	0/7
Vaccinati HVT-NDV	14213,36	15534,86	5,2	6,2	0/5

Fig.1 Titoli anticorpali in ELISA e in HI (log2) dei gruppi vaccinali, e analisi statistica: a) gruppo delle femmine b) gruppo dei maschi.

* Significativamente per valori di p< 0,05, ** Significativamente per valori di p< 0,01, *** Significativamente per valori di p< 0,001.

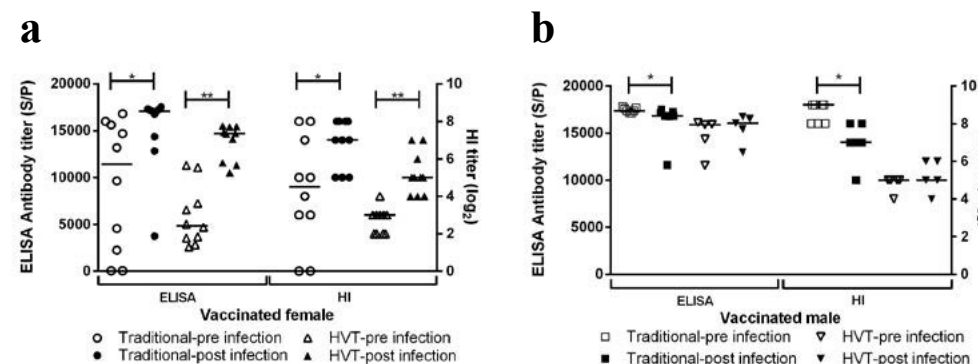
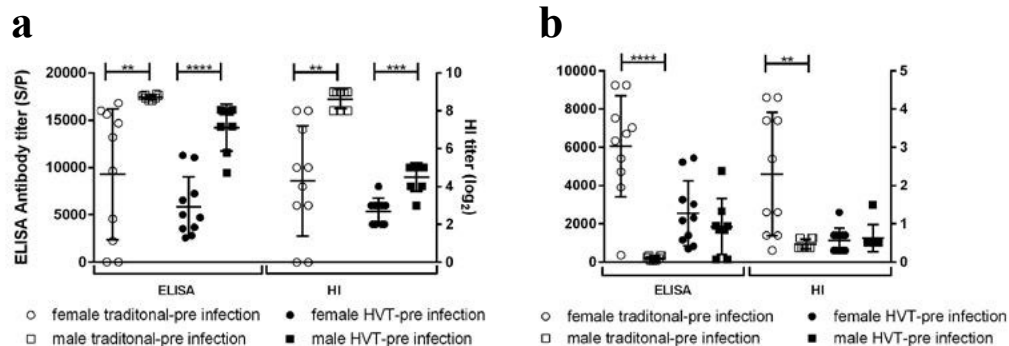


Fig.2 a) Titoli anticorpali in ELISA e in HI (log2) dei gruppi vaccinali, e analisi statistica; b) Deviazioni di ciascun titolo anticorpale (in ELISA e in HI) dalla media del gruppo di appartenenza.

* Significativamente per valori di $p < 0,05$, ** Significativamente per valori di $p < 0,01$, *** Significativamente per valori di $p < 0,001$.



BIBLIOGRAFIA

- Capua, I., Dalla, P. M., Mutinelli, F., Marangon, S., & Terregino, C. (2002). Newcastle disease outbreaks in Italy during 2000. *The Veterinary Record*, 150(18), 565–8. <https://doi.org/10.1136/vr.150.18.565>
- OIE Terrestrial Manual, Edition 2012. *Chapter 2.3.14 Newcastle Disease (infection with Newcastle Disease virus)*.
- Esaki, M., Godoy, A., Rosenberger, J. K., Rosenberger, S. C., Gardin, Y., Yasuda, A., & Dorsey, K. M. (2013). Protection and antibody response caused by turkey herpesvirus vector Newcastle disease vaccine. *Avian Diseases*, 57(4), 750–755. <https://doi.org/10.1637/10540-032613-Reg.1>
- Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., & Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
- Palya, V., Kiss, I., Tatár-Kis, T., Mató, T., Felföldi, B., & Gardin, Y. (2012). Advancement in Vaccination Against Newcastle Disease: Recombinant HVT NDV Provides High Clinical Protection and Reduces Challenge Virus Shedding with the Absence of Vaccine Reactions. *Avian Diseases*, 56(2), 282–287. <https://doi.org/10.1637/9935-091511-Reg.1>
- Palya, V., Tatár-Kis, T., Mató, T., Felföldi, B., Kovács, E., & Gardin, Y. (2014). Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158(1–2), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.11.008>

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UNA MISCELA DI ACIDI ORGANICI E FITOTERAPICI NEL CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA *ESCHERICHIA COLI* NEL TACCHINO

Parigi M.¹, Massi P.¹, Fiorentini L.¹, Tosi G.¹, Romboli C.¹, Vandi L.², Bocciero R.¹, Fregnani G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì;

²Biomim Holding GmbH, Industriestrasse 21, 3130 Herzogenburg, Austria

ABSTRACT

Colibacillosis is a systemic multifactorial disease caused by *E. coli* that still represents a major problem in the turkey industry worldwide. The aim of the present study was to test the effects of an enhanced feed acidifier on the replication of an antibiotic resistant *E. coli*. Ninety-six turkey poults of one day of age were randomly assigned to 4 poultry isolators (24 animals/isolator), fed with 4 different dietary treatments for 30 days and orally challenged with $1,38 \times 10^8$ cfu/mL of an antibiotic resistant *E. coli* strain. At day 20 and day 30, birds were euthanized in order to evaluate the presence of gross lesions of colibacillosis and an aliquot of their intestinal content and liver has been examined by bacteriological analysis. At any interval of the trial, birds of Group 2, treated with the highest dosage of acidifier, presented a lower *E. coli* population, both in the intestine and in the liver than the other groups and absent or mild lesions of colibacillosis. Thus, since feed acidifiers are included in poultry diets as alternative to antibiotic growth promoters, this *E. coli* reduction could lead to a reduced environmental contamination and, consequently, limit the horizontally diffusion of the pathogen.

INTRODUZIONE

Con colibacillosi si intende una malattia sistemica multifattoriale causata da *E. coli* che rappresenta, ancora oggi, una delle maggiori problematiche nell'allevamento dei tacchini a livello mondiale, a causa delle gravi conseguenze in termini di mortalità e ridotta conversione alimentare dei gruppi colpiti. La malattia si può presentare con diverse forme cliniche, quali colisetticemia, aereosacculite, perepatite e percardite. La frequenza e la gravità dell'infezione dipendono da tre fattori principali: lo stato sanitario del gruppo di animali, la presenza di fattori ambientali predisponenti e la virulenza del ceppo di *E. coli* coinvolto. Nonostante gli antibiotici siano stati, e sono tutt'ora, utilizzati per contrastare la replicazione del batterio, è necessario sia ridurre il loro utilizzo sia identificare valide sostanze alternative, in relazione al crescente numero di ceppi di *E. coli* antibiotico resistenti isolati proprio in corso di focolai di malattia (Huff et al., 2013). Lo scopo di questo studio è stato, quindi, quello di testare e valutare, *in vivo*, gli effetti di un acidificante alimentare potenziato sulla replicazione di un *E. coli* antibiotico resistente.

MATERIALI E METODI

Progettazione dello studio. Novantasei tacchini di un giorno di età (femmine, Big 6 Aviagen®) sono stati assegnati random a 4 isolatori (24 animali in ogni isolatore) corrispondenti a 4 diverse diete; in ogni isolatore, 4 animali non sono stati identificati. L'acqua e l'alimento somministrati agli animali sono stati testati per l'assenza di *E.*

coli, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp. Dal giorno 1 al giorno 3 dell'esperimento, tutti gli animali sono stati trattati con colistina in acqua di abbeverata (colistina 12%, 2ml/litro come previsto dalla casa produttrice). A partire dal giorno 4 fino alla fine dell'esperimento (30 giorni), ai 4 gruppi sono state somministrate le seguenti diete:

1. Controllo negativo (CN): dieta standard senza nessun supplemento;
2. Controllo positivo (CP): dieta standard + enrofloxacin 0,5 ml per litro di acqua;
3. Gruppo trattamento 1 (GT1): dieta standard + 1 kg per ton di dieta di additivo alimentare;
4. Gruppo trattamento 2 (GT2): dieta standard + 2 kg per ton di dieta di additivo alimentare.

L'additivo alimentare testato è un prodotto commerciale, Biotronic® Top3 (Biomin) composto da un complesso permeabilizzante (Biomin® Permeabilizing Complex, Biomin) più una miscela di acidi organici (acido formico, propionico e acetico) e un fitochimico (cinnemaldeide). Al giorno 11, tutti gli animali in ogni gruppo sono stati infettati per via orale con $1,38 \times 10^8$ ufc (unità formanti colonia) per mL di *E.coli*. Il ceppo usato era un ceppo di campo, sierotipo O78, resistente all'enrofloxacin ed isolato nel 2014 durante un focolaio di colisetticemia in un allevamento di tacchini. Prima dell'infezione con *E.coli* e in seguito al trattamento con la colistina, i 4 animali non identificati in ogni isolatore sono stati soppressi mediante dislocazione cervicale ed il loro contenuto intestinale analizzato mediante analisi batteriologica così da confermare l'assenza sia del sierotipo di *E.coli* inoculato sia di qualsiasi altro ceppo di *E.coli*. In seguito, al giorno 20 e 30 dell'esperimento, 10 tacchini in ogni isolatore sono stati soppressi mediante dislocazione cervicale ed il contenuto intestinale esaminato mediante analisi batteriologica.

Valutazione delle lesioni. Durante l'esame necroscopico degli animali, l'eventuale presenza di lesioni macroscopiche al fegato sono state valutate utilizzando il seguente punteggio modificato da Van Eck e Goren (1991): 0, assenza di lesioni; 0,5 presenza di una lesione infiammatoria circolare a capocchia di spillo bianca o marrone; 1 presenza di due o più lesioni infiammatorie circolari a capocchia di spillo; 2, presenza in vari organi di un sottile strato di essudato fibrinoso; 3, massiva presenza di essudato fibrinoso denso. È stato, quindi, calcolato il punteggio medio delle lesioni rilevate in ciascun gruppo.

Conta delle colonie di *E.coli* ed *Enterobacteriaceae*. Un grammo di contenuto intestinale ed un grammo di fegato sono stati diluiti in acqua peptonata e diluiti serialmente. Da ciascun campione, 100 μ L sono stati seminati su Triptone Bile Agar con glucuronide (TBX-agar) per l'isolamento e la conta di *E.coli* e su Violet Red Bile Glucosio Agar (VRBGA) per l'isolamento e la conta delle *Enterobacteriaceae*. I risultati sono stati espressi come unità formanti colonia (ufc) per grammo di tessuto o contenuto intestinale. Le colonie di *E.coli* isolate al giorno 20 e 30 sono state successivamente tipizzate sierologicamente (mediante il test della siero agglutinazione utilizzando antisieri specifici) per l'antigene O così da verificare che le colonie di *E.coli* isolate corrispondessero al sierotipo inoculato.

Analisi statistica. Le conte batteriche sono state trasformate e analizzate mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis utilizzando il software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Il numero di animali con le lesioni riferibili a colibacillosi sono stati confrontati mediante il test del Chi-Quadro, aggiustato mediante la correzione di Yates, mentre la media delle lesioni sono state confrontate utilizzando il test di Mann-Whitney.

La significatività statistica è stata considerata per valori di $P \leq 0,05$.

RISULTATI

Conte batteriche. A qualsiasi intervallo dell'esperimento, il numero di colonie di *Enterobacteriaceae* isolate nel tratto intestinale dei tacchini del GT2 è risultato inferiore ($P \leq 0,05$) rispetto agli animali dei gruppi GT1 e CP. Al giorno 30 dell'esperimento, il numero di ufc isolate dagli intestini degli animali del GT2 è risultato significativamente inferiore rispetto a quello isolato dai gruppi CN e CP ($P \leq 0,05$). Colonie di *E.coli* sono state isolate negli intestini di tutti gli animali infettati, a prescindere dalla dieta ricevuta (Fig. 1-2) e non sono state mai rilevate differenze statisticamente significative tra il numero di colonie isolate nei gruppi CN, CP e GT1. Al contrario, sia al giorno 20 sia al giorno 30 dell'esperimento, le ufc di *E.coli* isolate dagli animali del GT2 sono risultate statisticamente inferiori ($P \leq 0,05$) delle ufc isolate, rispettivamente, dai tacchini del gruppo GT1 e dei gruppi di controllo. Per quanto riguarda, invece, la ricerca di *E.coli* dai fegati (Fig. 1-2), al giorno 20 non sono state isolate colonie dai fegati degli animali trattati con l'additivo alimentare al dosaggio di 2 kg/ton di alimento. Al giorno 30, invece, il numero di colonie di *E.coli* rinvenute dai fegati degli animali di questo gruppo sono risultate non solo inferiori rispetto ai gruppi CP e GT2, ma anche statisticamente inferiori rispetto al CN ($P \leq 0,05$). La sierotipizzazione dei ceppi batterici isolati durante l'esperimento ha confermato la presenza di *E.coli* O78 in tutti gli animali.

Lesioni macroscopiche. Al giorno 20 dell'esperimento, il 60% degli animali dei gruppi CN e CP e il 20% degli animali del gruppo GT1 hanno mostrato lesioni riferibili a colibacillosi, con un punteggio medio di 0.75, 0.50 e 0.17 rispettivamente (Fig.3). Al giorno 30, anche gli animali del GT2 hanno presentato lesioni (60% dei tacchini) con un punteggio medio di 0.30, mentre tutti gli animali degli altri gruppi presentavano lesioni con un punteggio di 0.89 nel CN, 0.85 nel CP e 0.75 nel GT1 (Fig.3); queste differenze sono risultate statisticamente significative ($P \leq 0,05$).

DISCUSSIONI

L'attività antibatterica nei confronti dei batteri Gram-negativi dei componenti dell'additivo alimentare testato (Biotronic® Top 3, Biomin) era già stata dimostrata in precedenza mediante test *in vitro* (Riemensperger et al., 2012); da questi risultati preliminari, infatti, era stato desunto che i componenti del prodotto risultavano più efficaci se usati combinati, dimostrando un sinergismo di azione. Infatti, il complesso permeabilizzante contenuto nell'acidificante, destabilizzando la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, facilita la penetrazione della cinnemaldeide e degli acidi organici all'interno delle cellule batteriche. La cinnemaldeide risulta avere un'importante azione antibatterica in quanto si lega alla proteina FtsZ, implicata nel fenomeno della divisione cellulare, inibendo, quindi, la replicazione dei batteri (Domadia et al., 2007). Il meccanismo di azione degli acidi organici nei confronti dei batteri è duplice: in primo luogo, agiscono riducendo il pH dell'alimento ed inibendo la crescita batterica; in secondo luogo, nella loro forma non dissociata riescono a penetrare la parete cellulare batterica, andandone ad alterare le funzioni vitali (Hansen et al., 2007). In questo studio *in vivo*, il gruppo di animali trattato con l'acidificante al dosaggio di 2kg/ton di alimento ha presentato una riduzione del numero di colonie di *E.coli* e di *Enterobacteriaceae*, isolate dal tratto intestinale, rispetto agli animali dei gruppi di controllo. Quindi, possiamo affermare che, alle nostre condizioni sperimentali, questo dosaggio è risultato efficace nel controllare la

replicazione di un ceppo antibiotico resistente di *E.coli*. In uno studio precedente, abbiamo testato l'efficacia dello stesso prodotto nei confronti di un ceppo di *Salmonella* Enteritidis inoculata sperimentalmente, per via oculo nasale, in un gruppo di polli SPF ed entrambi i dosaggi del prodotto, sia 1kg/ton sia 2kg/ ton di alimento, avevano portato ad una riduzione significativa della concentrazione cecale di *Salmonella* nei gruppi trattati rispetto ai gruppi di controllo (comunicazione personale). Considerando che, sia *E.coli* sia *Salmonella* Enteritidis sono batteri Gram-negativi, possiamo, quindi, desumere che la minore efficacia del prodotto al dosaggio di 1 kg/ton rilevata in questo studio sia legata alla elevata resistenza del ceppo di *E.coli* inoculato, nello specifico un ceppo di campo antibiotico resistente naturalmente selezionato. Nonostante il numero di colonie di *E.coli* isolate dal tratto intestinale del gruppo GT2 fosse significativamente inferiore, abbiamo ugualmente rilevato la traslocazione del batterio in sede epatica anche nel GT2, anche se in minor misura rispetto agli altri gruppi. Ad ogni modo, la dimostrazione della scarsa replicazione batterica negli animali del GT2 è stata altresì dimostrata dalle blande lesioni anatomopatologiche rilevate negli animali in sede necroscopica (Fig.3). Inoltre, nonostante la supplementazione del prodotto non abbia inibito completamente la replicazione di *E.coli*, possiamo ipotizzare che una riduzione di 2 log₁₀ del numero di colonie isolate rispetto ai gruppi di controllo possa portare ad una riduzione della sua eliminazione nell'ambiente e, quindi, limitare la trasmissione orizzontale del patogeno in allevamento (Grilli et al., 2011). In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio sono promettenti e incoraggianti; in particolare, considerando sia l'importanza del patogeno utilizzato sia il suo essere antibiotico resistente, l'additivo alimentare testato può essere ritenuto una valida alternativa agli antibiotici nel controllo degli agenti patogeni intestinali in una panorama zootecnico mondiale sempre più antibiotic-free.

BIBLIOGRAFIA

Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical. Pharmacology* 74:831–840.

Grilli E., Tugnoli B., Fromigoni A., Massi P., Fantinati P., Tosi G. and Piva A. (2011). Microencapsulated sorbic acid and nature-identical compounds reduced *Salmonella* Hadar and *Salmonella* Enteritidis colonization in experimentally infected chickens. *Poultry Science* 90 :1676–1682.

Hansen C.F., Riis A.L., Bresson S., Hojbjerg O., Jensen B.B. (2007). Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science* 108: 206–209.

Huff G.R., Huff W.E., Jalukar S., Oppy J., Rath N.C. and Packialakshmi B. (2013). The effects of yeast feed supplementation on turkey performance and pathogen colonization in a transport stress/*Escherichia coli* challenge. *Poultry Science* 92:655-662.

Riemensperger A.V., Bachinger D., Schaumberger S., Urbaityte R., Pastiner S., (2012). The effect of an organic acid blend, cinnamaldehyde and a permeabilising substance on the inhibition of bacterial growth in vitro and growth performance of weaning pigs. *Veterinarija Jr Zootechnika (Vet Med Zoot)*. T. 60:82, 59-66.

Van Eck J.H.H. and Goren E. (1991). An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: Vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines. *Avian Pathology*, 20:3, 497-507.

Fig. 1: Colonie di *E.coli* isolate nei 4 gruppi da intestino e fegato al giorno 20 dell'esperimento

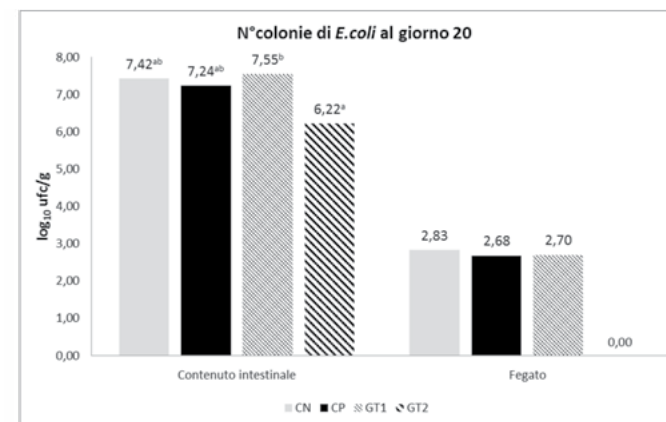


Fig. 2: Colonie di *E.coli* isolate nei 4 gruppi da intestino e fegato al giorno 30 dell'esperimento

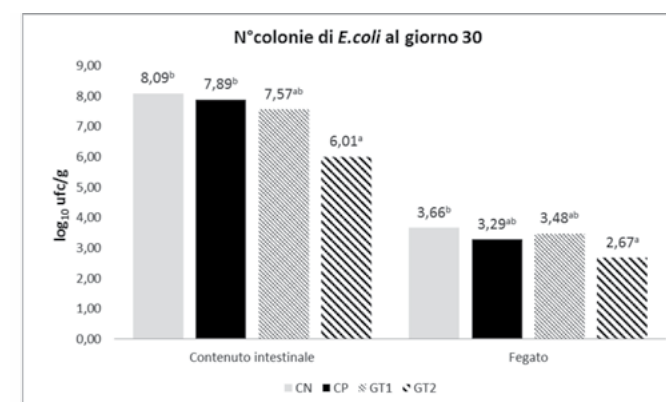
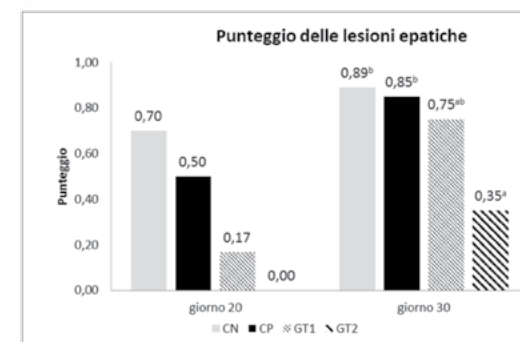


Fig. 3: Valutazione delle lesioni epatiche in sede necroscopica



CIRCOLAZIONE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS NETB* POSITIVI IN ALLEVAMENTI AVICOLI DEL CENTRO ITALIA

Profeta F.^{1*}, Di Giannatale E.², Scacchia M.², Orsini M.², Toscani T.³, Marsilio F.¹, Di Francesco C.E.¹

¹University of Teramo, Faculty of Veterinary Medicine, Loc. Piano D'Accio, 64100 Teramo, Italy

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", 64100, Teramo, Italy

³Gesco Cons. Coop a r.l., Via Bacchelli 1, Loc. Casemolino, 64020, Castellalto, Teramo, Italy

* Presenting author: fprofeta@unite.it

Keywords: Poultry, Necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, PFGE, *netb* gene.

Summary

Clostridium perfringens (CP) is one of the main pathogen involved in enteric diseases in poultry. NetB, a pore-forming toxin plasmid encoded, is considered the main responsible for the mechanism involved in enterocyte damage during infection (1; 4; 5).

Aim of this study is to evaluate the presence of *netb* positive CP strains in broiler and turkey flocks.

Environmental specimens and selective intestinal samples were evaluated for CP by means microbiological, biomolecular and histological investigation.

Genetic diversity among detected strains was investigated by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Finally, the complete *netb* toxin-coding gene from n. 2 clostridial strains has been sequenced.

This study represents the first attempt to evaluate the presence of *netb* positive CP strains in poultry flocks located in Central Italy and to provide further insight into the genetic relatedness between strains circulating in this part of Italy and strains recovered elsewhere.

INTRODUZIONE

L'Enterite necrotica (EN) è una patologia di frequente riscontro nel settore avicolo industriale, la cui evoluzione, subclinica o clinicamente manifesta, ha conseguenze negative, oltre che in termini di salute degli animali allevati, anche di tipo economico. *Clostridium perfringens* (CP), agente eziologico della suddetta patologia, è un batterio Gram positivo, anaerobio e sporigeno, di forma bastoncellare, piuttosto sottile e di piccole dimensioni (0,2 X 2-5 µm), a distribuzione ubiquitaria, produttore di tossine, alcune delle quali attive a livello enterico; il tossinotipo responsabile dell'EN delle specie avicole è il tipo A. Sebbene per molto tempo la tossina α sia stata ritenuta l'effettiva responsabile della malattia, studi recenti hanno evidenziato che l'elemento chiave nell'induzione della EN è una tossina "minore", la proteina *Necrotic enteritis toxin B-like*

(NetB), identificata per la prima volta nel 2008 in Australia (5). Uno studio eseguito nel 2009 a partire da campioni raccolti in allevamenti del Nord Italia ha rivelato la presenza del gene *netb* nel 27% dei 107 ceppi di CP provenienti da broiler e da ovaiole, di cui il 93% associati a segni clinici ascrivibili a EN (2); a conferma della presenza di questi ceppi contestualmente all'enterite necrotica; in seguito, in occasione di un focolaio di malattia verificatosi nel 2013 in due allevamenti di galline ovaiole, sono stati isolati 2 ceppi di CP *netb*-positivi (3). Recentemente, uno studio eseguito su 106 ceppi -positivi isolati da tacchini da carne e da riproduzione con sintomatologia sospetta, non ha portato, invece, ad alcuna identificazione di ceppi *netb* (4).

La presente indagine ha avuto lo scopo di valutare la presenza di ceppi di CP *netb* positivi anche in allevamenti avicoli del Centro Italia, data l'assenza di informazioni epidemiologiche relative alla circolazione dei suddetti ceppi, nonché all'incidenza della patologia in questo territorio.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento ha avuto inizio a Novembre 2015, è terminato a Maggio 2017 e ha interessato un n. 15 allevamenti; la maggior parte delle strutture visitate era situata in Provincia di Teramo, ad eccezione dei campionamenti verificatisi su indicazione dei rispettivi Medici Veterinari presso le Province di Fermo, Foggia, Forlì e Bologna.

Quando pianificato, il campionamento ambientale, a cadenza settimanale, è stato eseguito mediante l'impiego di soprascarpe (Agritamp plus02, Biogenetics, Padova, Italia). Altre volte, su segnalazione di sintomatologia sospetta, il campionamento ha previsto sia l'impiego di soprascarpe che il recupero di carcasse di animali deceduti. Complessivamente, sono stati recuperati n. 117 paia di soprascarpe e n. 51 carcasse.

Isolamento e identificazione; indagini anatomo-istopatologiche

I campioni raccolti mediante soprascarpe sono stati diluiti al 10% p/v in soluzione fisiologica sterile, quindi miscelati mediante *Stomacher* (VWR International pbi, Milano, Italia). Un ml della miscela così ottenuta è stata dapprima trattata termicamente a 75° C per 20 minuti, allo scopo di eliminare le forme batteriche vegetative presenti nel campione e, quindi, trasferito in brodo Brain Heart Infusion (BHI) in rapporto 1:5 v/v.

Le carcasse sono state sottoposte ad esame necroscopico; particolare attenzione è stata data all'osservazione del digerente, allo scopo di identificare eventuali lesioni macroscopiche del piccolo intestino; in tali casi, sezioni d'intestino sono state sottoposte ad esame istologico, previa colorazione con Ematossilina ed Eosina e di Gram, al fine di caratterizzare le lesioni identificate.

Inoltre, sono state prelevate tre porzioni d'intestino da ciascun animale, conformemente a quanto riportato in precedenti lavori, da destinare alle successive indagini microbiologiche (3).

A tal fine i campioni di intestino sono stati trasferiti in 10 ml di tioglicollato

rigenerato e, anche questi sottoposti a trattamento termico a 75° C per 20'. Entrambe le miscele così ottenute (BHI e tioglicollato) sono state poste ad arricchimento in anaerobiosi (GenBag Anaer, BioMerieux, Francia) per 24 ore alla temperatura di 37 ± 2° C, per essere successivamente trasferite su piastre di Agar sangue, mentre un'aliquota è stata destinata all'estrazione del DNA, utile nelle successive prove biomolecolari.

Le colonie batteriche morfologicamente riferibili al genere *Clostridium*, rotondeggianti, traslucide e caratterizzate da un doppio alone di emolisi, sono state sottoposte a colorazione di Gram, tipizzazione biochimica con sistema VitekÒ (Biomerieux, Francia) e tipizzazione molecolare.

Estrazione del DNA e real-time PCR per i geni *cpa* e *netb*

L'estrazione del DNA batterico è stata eseguita mediante *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit* (Promega, Italia), a partire da aliquote di 300 µl di BHI e tioglicollato (utilizzati per miscelare i campioni di sovrascarpe e di intestino, rispettivamente), oltre che dalle colonie, per confermare l'avvenuto isolamento in purezza.

Al fine di identificare i ceppi di CP tossinotipo A e *netb* positivi, è stato scelto un protocollo di *real-time* PCR a partire dagli estratti di DNA ottenuti sia da brodocoltura che dalle colonie ottenute in purezza.

Tale protocollo consente di identificare e amplificare, attraverso lo stesso ciclo, specifiche porzioni del gene *cpa*, codificante per la tossina α (402 bp) di CP, e del gene plasmidico *netb* (75 bp), codificante per la tossina netB, facendo ricorso a due coppie distinte di primers, e sfruttando le due diverse temperature di *melting* (77 ± 1,5° C e 72 ± 1,5° C, rispettivamente) di ciascun amplificato target eseguendo il protocollo cortesemente fornito dal gruppo di lavoro del Dipartimento di Patologia generale, Batteriologia e Patologia aviaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Gent, Belgio (1).

Caratterizzazione dei ceppi di *Clostridium perfringens* mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

I ceppi di CP isolati e identificati in seguito alle prove microbiologiche e biomolecolari sono stati sottoposti a caratterizzazione genetica mediante PFGE, seguendo le indicazioni riportate da Lhys e colleghi, con alcune modifiche (6).

Sequenziamento del gene *netb* ed analisi filogenetica

L'estratto di DNA di un ceppo di CP *netb* positivo recuperati nel corso della presente indagine, da carcasse di tacchino è stato sottoposto ad amplificazione e sequenziamento dell'intero gene plasmidico codificante la tossina NetB.

Inoltre, l'amplificato di 960 bp è stato tradotto nella sequenza amminoacidica corrispondente facendo ricorso all'applicazione web *Sequence manipulation suite-SMS* (<http://www.bioinformatics.org>) ed è stato, quindi, identificato mediante la comparazione con analoghe sequenze amminoacidiche depositate in *GenBank* attraverso il programma *Blastp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

RISULTATI

In seguito all'esame necroscopico, è stato possibile osservare lesioni riferibili ad enterite in n. 4 carcasse esaminate, di cui n. 3 tacchini provenienti da allevamenti delle Province di Fermo e di Forlì- Cesena, ed n. 1 broiler di un allevamento di Teramo. Le lesioni erano localizzate a livello del piccolo intestino, la cui parete appariva ispessita a causa dell'edema infiammatorio, e sulla sua superficie l'epitelio, in evidente necrosi, era ricoperto da pseudomembrane biancastre o marrone chiaro, piuttosto estese. L'istologia ha confermato la presenza di necrosi dei villi, la cui architettura risultava decisamente alterata, con detriti cellulari e ammassi di batteri di forma bacillare positivi alla colorazione di Gram.

Le prove d'isolamento hanno consentito di recuperare n. 85 isolati riferibili a CP, quindi stoccati in Microbank™ a -80° C per ulteriori impieghi.

Centosessantacinque estratti di DNA sono stati sottoposti ad amplificazione mediante *real-time* PCR, n. 150 dei quali *cpa* positivi (90%); tra questi, n. 34 (22%) sono risultati anche *netb* positivi. Gli estratti *netb* positivi provengono da due allevamenti, uno di tacchini della Provincia di Teramo, sottoposto a campionamento settimanale, e nel quale era stata data indicazione di disturbi enterici, di moderata entità, intorno alle tre settimane di vita degli animali, e un allevamento localizzato in Provincia di Foggia che ospitava broiler allevati all'aperto, oggetto di un singolo campionamento avvenuto in seguito a sospetto clinico.

La PFGE è stata applicata su n. 45 ceppi di CP derivanti dagli allevamenti oggetto di studio; inoltre sono stati inclusi nella prova n. 6 ceppi di CP provenienti dal Dipartimento di Patologia Generale, Batteriologia e Patologia aviaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Gent, Belgio, ed n. 2 ceppi, cortesemente forniti dal Dott. Luca Bano, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, laboratorio di Treviso (IZSVE).

Sono stati identificati n. 34 pulsotipi distinti di CP. I campioni aventi un'identità $\geq 90\%$ sono stati considerati appartenenti alla stessa popolazione e tra questi n. 6 coppie hanno riportato un'identità pari al 100%. La sequenza del gene plasmidico è stata depositata nella banca dati GenBank, con Acc. No. KY923245 e nome "NetB_FP69_ITA_2017_Turkey" e la comparazione con sequenze analoghe depositate su *GenBank* ha confermato l'identità del gene *netb*. L'analisi filogenetica ha permesso di evidenziare la relazione genetica esistente con analoghe sequenze disponibili in banca dati, prevalentemente di origine danese e belga, inclusi due isolati provenienti dal Canada e dall'Australia.

DISCUSSIONE

Il presente lavoro riporta i risultati di un monitoraggio ambientale, eseguito nel corso di un anno e mezzo, avente l'obiettivo di valutare la circolazione di ceppi di CP *netb* positivi negli allevamenti avicoli del Centro Italia. Inoltre, sono stati identificati per la prima volta in Italia ceppi CP *netb* positivi anche in allevamenti di tacchini; in tali casi, l'isolamento è avvenuto nel corso del campionamento settimanale in concomitanza di segni clinici moderati ma senza lesioni evidenti all'esame necroscopico.

Lesioni imponenti di enterite necrotica, con aumento dell'indice di mortalità nell'allevamento, sono state osservate in presenza di ceppi di CP *cpa* positivi ma

non produttori di tossina NetB. Questi dati lasciano ipotizzare che l'insorgenza dell'enterite necrotica nel pollo e nel tacchino non dipenda soltanto dalla presenza di clostridi *netb* positivi, così come la sola presenza di questi ultimi non sembra essere sufficiente a determinare lesioni evidenti. Difatti, il ruolo della porina NetB è stato evidenziato solo negli ultimi anni ma ciò non toglie che anche altre tossine clostridiali possano intervenire nella patogenesi dell'EN.

I risultati della prova di PFGE ottenuti in questo lavoro sono stati messi in relazione con alcune variabili quali la sede dell'allevamento, la specie ospite e la matrice campionata, con lo scopo di formulare ipotesi circa la diversità genetica, l'origine e la diffusione dei ceppi raccolti.

Dall'analisi del dendrogramma è emersa una notevole eterogeneità tra i ceppi, con assenza di uno o pochi ceppi dominanti e provvisti di maggiore patogenicità, in analogia con quanto riportato in precedenti studi eseguiti a partire da ceppi recuperati in occasione di quadri clinici di moderata entità. Al contrario, l'analisi filogenetica del gene *netb* ha permesso di evidenziare una sostanziale identità con le analoghe sequenze finora disponibili in banche dati.

Nonostante tali perplessità, è possibile affermare che la *real-time* PCR adottata possa rappresentare un metodo diagnostico rapido, ma allo stesso tempo sensibile e specifico, in grado di confermare i sospetti di malattia. Ciò consentirebbe di intervenire tempestivamente attraverso terapie mirate ma, soprattutto, con piani di controllo, così da limitare le forme cliniche di infezione nel medio e lungo periodo.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro fornisce nuove informazioni relative alla diffusione di CP negli allevamenti avicoli industriali del Centro Italia, identificando, mediante metodiche microbiologiche classiche e biomolecolari, ceppi di CP di tipo A e fra questi, i portatori del gene *netb* (notoriamente più virulenti).

Pertanto, sulla base dei dati finora disponibili e dei risultati del presente lavoro, sarebbe interessante approfondire le conoscenze relative a CP, in particolare l'interazione ospite- microorganismo, per poter meglio fronteggiare questa temibile patologia per il settore avicolo, senza trascurare l'attuale approccio *One health* della Comunità Scientifica, secondo cui la sanità umana, quella animale e la tutela dell'ambiente sono da considerare come obiettivi prioritari e, soprattutto, correlati fra loro; dunque dalla tutela dei primi scaturiranno conseguenze positive anche per gli altri.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Antonissen G., Croubels S., Pasmans F., Ducatelle R., Eeckhaut V., Devreese M., Verlinden M., Haesebrouck F., Eeckhout M., De Saeger S., Antlinger B., Novak B., Martel A., Van Immerseel F. 2015. Fumonisin affect the intestinal microbial homeostasis in boiler chickens, predisposing to necrotic enteritis. *Vet. Res.* **46(1)**: 98.
- 2) Berto G., Agnoletti F., Drigo I., Tonon E., Vascellari M., Fracas V., Bano L., 2015. Clostridial co- infection episodes in commercial laying hens. *Avian Pathol.* **44 (3)**: 200- 203.

- 3) Drigo I., Agnoletti F., Bacchin C., Guolo A., Cocchi M., Bonci M., Bano L., 2009. Diffusion of *Clostridium perfringens* NetB positive strains in healthy and diseased chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* **8** (4): 761- 764.
- 4) Giovanardi D., Drigo I., De Vidi B., Agnoletti F., Viel L., Capello K., Berto G., Bano L. 2016. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from diseased turkeys in Italy. *Avian pathol* **45**(3), 376- 380.
- 5) Keyburn A.L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T.L., Ford M.E., Parker D., 2008. *NetB*, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *Plos Pathog.* **4**, 26.
- 6) Lyhs U., Perko-Mäkelä P., Kallio H., Brockmann A., Heinikainen S., Tuuri H., Pedersen K. 2013. Characterisation of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poul. Sci.* **92**, 1750-1757.

ATTIVITÀ VETERINARIE DEL CENTRO RECUPERO ANIMALI SELVATICI DI NAPOLI NEL 2016

Rampa L.¹, Borrelli L.², Gargiulo A.¹, De Luca Bossa L.M.¹, Paone S.², Raia P.¹, Fioretti A.², Dipineto L.²

¹ Centro di Recupero Animali Selvatici Federico II di Napoli; ² Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II

Summary

The aim of this study was to describe the main reasons of hospitalization and the related follow-up of wild birds brought to the Wildlife Rescue and Rehabilitation Center (CRAS) Federico II of Naples. A total of 1583 wild birds belonging to different orders were admitted to this CRAS. Trauma was the most frequent cause of recovery and occurred in 39% of the animals; 23% were admitted because immature; 22% were sequestered animals; 8% were represented of medical cases and 8% were admitted for "other causes". The follow-up showed that 60% of the birds were released, 11% and 24 % had to be euthanized or died, respectively, whereas 3% is still hospitalized and 2% was entrusted. In this CRAS, epidemiological investigations on infectious and parasitological agents were also conducted. In this context, 148 intestinal contents were collected from birds of prey carcasses to isolate *Campylobacter* spp., *E. coli*, and *Salmonella* spp. which showed a prevalence of 33.1%, 6.8% , and 6.8%, respectively. Furthermore, 145 samples of faeces were collected from animals admitted to the center to detect endoparasites showing a positivity of 68% for endoparasites mainly represented by *Capillaria* spp., *Centrorhynchus* spp., Ascarididae and Eimeriidae families. We may conclude that a CRAS plays an essential role on an environment, because the wildlife may act as sentinels of ecosystem health in order to supply significant information about the health status of the natural environment where animals live, which is itself connected to public health issues.

INTRODUZIONE

Con Decreto Dirigenziale n. 94 del 06.05.2010 venne istituito, in Regione Campania, il primo Centro Recupero Animali Selvatici (CRAS) dell'attuale Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli Federico II. Il CRAS Federico II è ubicato presso il Presidio Ospedaliero Veterinario dell'ASL Napoli 1 Centro e opera, nell'ambito delle sue attività, in sinergia con il Centro di Riferimento Regionale per l'Igiene Urbana Veterinaria (CRIUV) che ha come finalità quella di fungere da strumento operativo di approfondimento ed analisi del rischio in materia di igiene urbana veterinaria. Lo scopo del CRAS Federico II è, invece, quello di reintrodurre in natura la fauna selvatica, qualora ne sussistano le condizioni, a seguito del ricovero, della cura e della riabilitazione. Fondamentale è, inoltre, il ruolo di monitoraggio del territorio che assume un CRAS, in quanto la fauna rappresenta un ottimo bio-indicatore in grado di fornire rilevanti informazioni sulle condizioni sanitarie dell'ambiente in cui vivono gli animali (Schwartz, 2007). Lo scopo del presente studio è quello di illustrare le principali attività veterinarie svolte dal Centro Recupero Animali Selvatici Federico II di Napoli prendendo in

considerazione le cause di ricovero e il relativo follow-up di volatili selvatici ospedalizzati durante il 2016.

MATERIALI E METODI

Nel corso del 2016 sono stati ricoverati presso il CRAS Federico II di Napoli 1583 volatili di diverse specie appartenenti agli ordini Passeriformes (n=566), Charadriiformes (n=250), Columbiformes (n=203), Falconiformes (n=145), Apodiformes (n=164), Strigiformes (n=96), Accipitriformes (n=76), Psittaciformes (n=20), Anseriformes (n=14), Pelecaniformes (n=12), Galliformes (n=7), Phoenicopteriformes (n=7), Gruiformes (n=7), Bucerotiformes (n=3), Piciformes (n=4), Ciconiiformes (n=4), Caprimulgiformes (n=2), Podicipediformes (n=2), Suliformes (n=1).

Gli animali venivano portati al Centro dalle ASL territoriali, dai privati cittadini, dalle forze dell'ordine/di soccorso e da alcune associazioni/enti.

La principale causa di ricovero era rappresentata da eventi traumatici come fratture di vari segmenti scheletrici, ferite, lussazioni, paralisi, ferite da arma da fuoco, traumi cranici, lesioni oculari che avvenivano nel 39% degli animali ricoverati. Il 23% degli animali, invece, giungeva al centro in quanto ancora immaturo e, quindi, non in grado di provvedere autonomamente alla propria sopravvivenza. Il 22% è stato consegnato al CRAS poiché oggetto di sequestro a seguito delle attività di Polizia Giudiziaria, condotte dagli Organi preposti quali Polizia di Stato, Polizia Municipale, Corpo Forestale dello Stato, Polizia Provinciale, Carabinieri e Guardia di Finanza, o da personale autorizzato dalle normative vigenti. Le principali cause di sequestro erano rappresentate dalla detenzione illegale e dal maltrattamento.

Problematiche cliniche quali denutrizione, intossicazione, malattie infettive, costituivano l'8% delle cause di ricovero così come l'8% era dato dalle cosiddette "altre cause" (i.e. giunto deceduto, aufugo, imprinting, detenzione impropria, lesioni al piumaggio).

Tutti gli animali ricoverati presso il CRAS Federico II venivano sottoposti ad accurata visita clinica e ad approfondimento diagnostico anche mediante l'ausilio di esami radiografici e Tomografia Computerizzata.

Al fine di ottenere un dato epidemiologico sulla prevalenza di alcuni agenti patogeni, durante le attività del CRAS Federico II sono state condotte, inoltre, indagini microbiologiche, parassitologiche e tossicologiche.

Nello specifico, sono stati raccolti 135 tamponi cloacali da rapaci ricoverati presso il CRAS per la ricerca di *Salmonella* spp.; 145 campioni di feci dagli animali ospitati al CRAS in modo da includere tutte le classi animali (uccelli, mammiferi, rettili) per esami coprologici effettuati per la ricerca di endoparassiti; 148 campioni di contenuto intestinale prelevati da rapaci in sede necroscopica per la ricerca di *Campylobacter* spp., *E. coli* e *Salmonella* spp.; 123 aliquote di organi e annessi cutanei raccolti da rapaci in sede necroscopica per la ricerca di sostanze tossiche.

RISULTATI

Dei 1583 volatili ricoverati nel 2016, il 60% è stato rilasciato a seguito della completa guarigione clinica; il 24%, invece, è deceduto mentre, l'11%, poiché

presentava lesioni molto gravi e incompatibili con il recupero, è stato sottoposto, previa sedazione, ad eutanasia. Il 3% figura tra gli esemplari definiti "lungodegenti", ossia, attualmente ospitati presso la struttura del CRAS Federico II. Infine, il 2% è in affido: categoria riservata agli animali la cui introduzione in natura è vietata.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dall'indagine epidemiologica, i 135 tamponi cloacali per la ricerca di *Salmonella* spp sono risultati costantemente negativi; dei 132 esami coprologici effettuati per la ricerca di endoparassiti il 68% è risultato positivo e i parassiti maggiormente riscontrati appartenevano al genere *Capillaria* spp., *Centrorhynchus* spp., e alle famiglie Ascarididae and Eimeriidae.

Per quel che concerne i 148 campioni di contenuto intestinale, il 33,1% (49/148) è risultato positivo a *Campylobacter* spp., il 6,8% (10/148) a *E. coli* e il 6,8% (10/148) a *Salmonella* spp. Tutti i *Campylobacter* spp. isolati (49/49) sono stati identificati come *C. jejuni* e tra questi 12/49 sono stati identificati anche come *C. coli* (infezioni miste). I 10 ceppi di *E. coli* sono stati tipizzati come *E. coli* O145 (n=5), O26 (n=3), O55 (n=2). Infine, i 10 isolati di *Salmonella* spp. sono stati sierotipizzati come *S. Napoli* (n=4), *S. salamae* (n=3), *S. Typhimurium* (n=3). Gli esami tossicologici sono ancora in corso.

DISCUSSIONE

Un CRAS ha come funzione fondante quella di detenere, curare e riabilitare esemplari appartenenti alla fauna selvatica, allo scopo di liberarli qualora ne sussistano le condizioni o di detenerli in via permanente nel caso essi risultino irrecuperabili e non vengano sottoposti ad eutanasia. Al CRAS Federico II di Napoli, solo nell'anno 2016, sono stati ricoverati 1583 volatili, escludendo i mammiferi selvatici, il 60% dei quali è stato rilasciato dopo aver ricevuto gli opportuni trattamenti terapeutici/chirurgici e, quindi, a seguito della completa guarigione clinica. Il rilascio, anche di pochi individui, può rappresentare un grande contributo alla conservazione di quelle specie di cui esistono popolazioni numericamente ridotte, molto localizzate o a rischio di estinzione nell'immediato futuro (Csermely e Gaibani, 2002). Oltre a fornire le possibilità di sostenere demograficamente le popolazioni a vita libera e di sensibilizzare l'opinione pubblica, i centri di recupero costituiscono stazioni di inanellamento, osservatori epidemiologici e fonti di dati e materiali per la ricerca scientifica, come dimostrato dai nostri risultati che confermano il ruolo dei volatili selvatici quali diffusori di agenti patogeni a carattere zoonotico (e.g. *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.). L'attività di recupero della fauna selvatica svolta da un CRAS assume, quindi, per il mondo scientifico, un ruolo fondamentale non solo per la conservazione del patrimonio faunistico ma anche per fini epidemiologici in virtù della grande quantità di animali ospitati quotidianamente e delle informazioni che può fornire circa lo stato di salute dell'ambiente naturale in cui gli animali selvatici vivono.

BIBLIOGRAFIA

Csermely D, Gaibani G. (2002). Riabilitazione degli uccelli rapaci e loro sopravvivenza dopo il rilascio. In: Brichetti P, Gariboldi AL (Eds.), Manuale di ornitologia, Edagricole, Bologna, pp. 287-303.
Schwartz NA. (2007). An Introduction To Wildlife Rehabilitation, Xlibris Corporation, 132 P.



EVOLUZIONE DELLE LESIONI MACROSCOPICHE E MICROSCOPI- CHE DA WHITE STRIPING NEL BROILER

Russo E.¹, Felice V.², Recordati C.³, Tasoniero G.⁴, Dalle Zotte A.⁴, Catelli E.², Lupini C.², Longoni C.¹, Cecchinato M.⁴

¹ MSD Animal Health s.r.l., Via F.lli Cervi snc, Centro Direzionale Milano Due - Palazzo Canova, 20090, Segrate (MI).

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

³ Mouse & Animal Pathology Laboratory, Fondazione Filarete, Viale Ortles 22/4, 20139, Milano

⁴ Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD)

Summary

White striping (WS) is an alteration of broiler muscle characterized by the presence of white striations parallel to the direction of muscle fibers. WS affects mainly heavier birds, and is increasing his economic impact on meat production.

To evaluate the evolution of lesions 240 broilers were breed under field condition and groups of 80 birds were sacrificed at 12, 25 and 51 days. Breast were scored for WS (0=absence, 1=mild, 2=severe) and sampled for histology.

Each histological lesion (cell degeneration, presence of adipocytes inside the fiber, presence of fibrosis inside the fiber, presence of diffused inflammation, presence of vasculitis) was scored and an overall score was create to summarize microscopic alterations. The scores of cells degeneration, presence of adipocytes and fibrosis inside the muscular fiber correlates very well, indicating the 3 lesions develops together. Inflammation (both diffused and vasculitis) develops independently from others lesions.

The average scores at 12, 25 and 51 days of all parameters, and of macroscopic scores were compared and there was a significant difference in all parameters evaluated at different ages, confirming the evolution of lesions along time.

INTRODUZIONE

Il *white striping* (WS) è un'alterazione del muscolo del pollo da carne caratterizzata macroscopicamente da striature bianche parallele alla direzione delle fibre muscolari, in particolare sulla superficie ventrale del muscolo del petto (1).

Ad oggi, la patogenesi di WS non è ancora chiara, ma la sua prevalenza è maggiore in genotipi selezionati per l'elevata resa in petto (2) per il rapido accrescimento e con peso maggiore alla macellazione (3). Le proprietà nutrizionali della carne sono alterate, infatti le lesioni più gravi di WS sono associate ad un aumento della quantità di grasso a discapito del contenuto proteico (4). Anche le proprietà tecnologiche della carne sono modificate come il pH e il potere di ritenzione idrica. Dopo la cottura sono inoltre evidenti perdite di peso (2), aumento della durezza e consistenza gommosa (5).

Il consumatore non gradisce la carne fresca affetta da WS, a causa delle striature biancastre macroscopicamente visibili associate alla presenza di depositi di grasso

(6). Poichè le caratteristiche qualitative della carne e la scelta del consumatore sono influenzate negativamente dalla miopatia WS, quest'ultima è responsabile di danno economico per l'industria (6).

Dal punto di vista macroscopico le lesioni di WS sono state classificate in base alla dimensione e alla distribuzione delle striature bianche in 3 gradi: normale, moderato e severo, secondo lo *score* definito da Kuttappan et al. (6). Dal punto di vista istologico la descrizione qualitativa delle lesioni è stata ampiamente discussa (7, 8) e la miopatia è stata definita una miopatia di tipo degenerativo con lesioni polifasiche. In particolare sono presenti: fibre ipereosinofile e di forma rotondeggiante, perdita della loro striatura trasversale e variabilità della dimensione, presenza di lesioni degenerative a carico delle fibre, lisi delle fibre e successiva sostituzione di quelle danneggiate con adipociti e fibrosi, lieve mineralizzazione, rari fenomeni rigenerativi, fenomeni di infiammazione (edema, linfociti e macrofagi), fagocitosi delle fibre danneggiate e fibrosi interstiziale (7). L'infiltrazione degli adipociti è anche evidente nell'interstizio (9).

Scopo del presente lavoro è stato quello di definire uno *score* istologico per la valutazione delle lesioni di WS in polli da carne, e di valutare l'evoluzione delle lesioni macroscopiche e microscopiche nel corso di un ciclo produttivo di broiler.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

I campioni utilizzati per questa prova sono stati prelevati da 240 broiler (ibridi commerciali).

Gli animali sono stati alimentati con mangime commerciale: 1-12 giorni mangime starter, 13-25 giorni II periodo, 26-42 giorni III periodo, 42-51 giorni finissaggio.

Ottanta animali sono stati sacrificati ad ogni tempo di prelievo: a 12, 25 e 51 giorni. Per ogni animale sono stati registrati: peso del petto e punteggio macroscopico di WS secondo la scala di punteggi proposta da Kuttappan *et al.* (6). Dalla porzione craniale di ogni petto è stato prelevato un cubo di tessuto muscolare del lato di 2 cm circa per indagini istologiche.

Indagine istologica

Campioni di tessuto muscolare della porzione craniale del petto sono stati prelevati e fissati immediatamente in formalina tamponata al 10% e secondariamente inclusi in paraffina. Le sezioni ottenute al microtomo, di circa 5 µm di spessore, dopo sparafinatura, sono state colorate con Ematossilina ed Eosina.

Tutte le sezioni sono state osservate al microscopio ottico ed è stata eseguita una valutazione della degenerazione delle fibre muscolari, dell'infiammazione diffusa, della vasculite, del grado di lipidosi e di fibrosi. Per ogni sezione sono stati analizzati 10 campi microscopici ad un ingrandimento di 10x e ad ogni sezione è stato assegnato un punteggio da 0 a 3/4 per lesione, come riportato in tabella 1. Tutte le sezioni sono state valutate da due operatori in doppio cieco.

Tabella 1. Schema dei punteggi per la valutazione delle lesioni istologiche da WS.

Score	Degenerazione della fibra muscolare	Infiammazione diffusa	Vasculite	Aggregati lipidici interni alle fibre muscolari	Fibrosi interna alle fibre muscolari
0	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
1	Fibre alterate (fibre rotondeggianti/rigonfie/in lisi)	Occasionale (un solo aggregato di cellule infiammatorie)	Occasionale	Presenza occasionale di adipociti all'interno delle fibre muscolari	Presenza occasionale di fibrosi all'interno delle fibre muscolari
2	Fibre alterate + almeno una fibra in degenerazione	Presente in metà dei campi microscopici	50% dei vasi presenta vasculite	Il 50% delle fibre presentano adipociti al loro interno	Presenza di fibrosi all'interno del 50% delle fibre muscolari
3	Il 50% delle fibre sono alterate o degenerate	Presente in tutti i campi	Tutti i vasi presentano vasculite	Il 100% delle fibre presentano adipociti al loro interno	Presenza di fibrosi all'interno di più del 50% delle fibre muscolari con perdita del confine tra le fibre
4	Più del 50% delle fibre sono degenerate o sostituite da tessuto adiposo e/o fibroso	/	/	/	/

Analisi statistica

Il software utilizzato per l'analisi statistica è PSPP. Per la valutazione della correlazione tra i diversi parametri istologici valutati (degenerazione delle fibre muscolari, infiammazione diffusa, vasculite, presenza di adipociti e fibrosi) e tra essi ed i parametri derivati è stato utilizzato l'indice di correlazione di Pearson (ρ). Per il confronto tra gruppi è stata eseguita una ANOVA.

RISULTATI

Tutti i campioni analizzati hanno mostrato almeno una alterazione a livello istologico.

I parametri “degenerazione della fibra muscolare”, “aggregati lipidici interni alle fibre muscolari” e “fibrosi interna alle fibre muscolari” sono risultati fortemente correlati tra loro. Per le successive analisi si è deciso di inserire anche un parametro derivato dalla somma dei tre precedenti e che correla molto bene con tutti e tre (indice di correlazione rispettivamente $\rho=0,90$; $\rho=0,89$; $\rho=0,91$).

L’infiammazione diffusa e la vasculite non sono risultate correlate a nessun altro parametro e nemmeno tra loro.

La media e la deviazione standard dei risultati ottenuti a 12, 25 e 51 giorni per i parametri macroscopici e microscopici valutati nello studio sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2. Media e deviazione standard dei parametri valutati: punteggio macroscopico di WS, degenerazione cellulare, presenza di adipociti all’interno della fibra muscolare, presenza di fibrosi all’interno della fibra muscolare, punteggio complessivo, vasculite ed infiammazione diffusa.

Età	12	25	51
punteggio macroscopico WS (media \pm DS)	0	0,36 \pm 0,28	1,17 \pm 0,69
degenerazione (media \pm DS)	1,08 \pm 0,48	2,16 \pm 0,75	2,85 \pm 0,75
presenza di adipociti (media \pm DS)	0,27 \pm 0,35	0,84 \pm 0,59	1,86 \pm 0,90
presenza di fibrosi (media \pm DS)	0,29 \pm 0,34	0,42 \pm 0,57	1,32 \pm 1,06
punteggio complessivo (media \pm DS)	3,09 \pm 2,15	5,70 \pm 2,94	11,85 \pm 5,63
Vasculite (media \pm DS)	0,34 \pm 1,40	0,37 \pm 0,63	0,94 \pm 1,08
Infiammazione diffusa (media \pm DS)	0,47 \pm 0,49	0,81 \pm 0,83	1,64 \pm 1,06

Tutti i parametri considerati hanno dimostrato di avere un punteggio medio significativamente più alto man mano che l’età degli animali aumenta.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La presenza di anomalie a livello istologico a 12 giorni, sebbene in assenza di lesioni macroscopiche, fa presupporre che il danno muscolare che si sviluppa poi in WS inizi già durante la i primi 10 giorni del ciclo produttivo.

L’assenza di fenomeni infiammatori gravi a 12 giorni, quando il quadro istologico è caratterizzato prevalentemente da degenerazione di fibrocellule muscolari singole, fa supporre che la causa di tale degenerazione sia un fenomeno di natura apoptotica e non un fenomeno di natura immunitaria.

L’aggravarsi delle lesioni con l’età degli animali è tipica di una patologia a carattere cronico. Analizzando la sequenza delle lesioni presenti nei vetrini a differenti età si può osservare come la prima alterazione che compare è l’ingrossamento delle fibrocellule cellulari (*swollen cells*), seguito dalla loro degenerazione. A seguito della degenerazione le fibrocellule muscolari possono essere sostituite da adipociti o da depositi di tessuto fibroso.

Infiammazione diffusa e vasculite tendono ad aggravarsi man mano che l’animale cresce, ma non sono correlate alla gravità delle altre lesioni.

In conclusione le lesioni istologiche risultano evidenti già molto prima di quelle macroscopiche ed indicano un’insorgenza del WS già nella seconda settimana. Le lesioni istologiche si aggravano progressivamente nel corso del ciclo, come le lesioni macroscopiche. Ulteriori studi saranno necessari per individuare cause e fattori predisponenti di questo fenomeno.

BIBLIOGRAFIA

1. Kuttappan VA, Hargis BM, and CM Owens (2016). White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. *Poultry Science*. 95:2724–2733.
2. Petracci M, Mudalal S, Bonfiglio A, and Cavani C (2013). Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*. 92:1670–1675.
3. Kuttappan VA, Brewer VB, Mauromoustakos A, McKee SR, Emmert JL, Meullenet JF, and Owens CM (2013a). Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*. 92:811–819.
4. Kuttappan VA, Brewer VB, Apple JK, Waldroup PW, and Owens CM (2012a). Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*. 91:2677–2685.
5. Sanchez Brambila G, Bowker BC, and Zhuang H (2016). Comparison of sensory texture attributes of broiler breast fillets with different degrees of white striping. *Poultry Science*. 95:2472-6.
6. Kuttappan VA, Lee YS, Erf GF, Meullenet GFC, McKee SR, and Owens CM. (2012b). Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poultry Science*. 91:1240–1247.
7. Kuttappan VA, Shivaprasad HL, Shaw DP, Valentine BA, Hargis BM, Clark FD, McKee SR, and Owens CM (2013b). Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poultry Science*. 92:331–338.
8. Mazzoni M, Petracci M, Meluzzi A, Cavani C, Clavanzani P, and Sirri F. (2015). Relationship between pectoralis major muscle histology and quality traits of chicken meat. *Poultry Science* 94:123–130.
9. Baldi G, Soglia F, Mazzoni M, Sirri F, Canonico L, Babini E, Laghi L, Cavani C and Petracci M. (2016). Implications of white striping and spaghetti meat abnormalities on meat quality and histological features in broilers. *Animal*: 1 - 10.

EPIDEMIOLOGIA DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* NEL POLLO DA CARNE IN ITALIA

Tucciarone C. M.¹, Franzo G.¹, Lupini C.², Torres Alejo C.³, Listorti V.², Mescolini G.², Brandão P. E.³, Martini M.¹, Catelli E.², Cecchinato M.¹

¹Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, viale dell'Università 16, Legnaro 35020, PD, Italia;

²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia 40064, BO, Italia;

³Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, College of Veterinary Medicine, University of São Paulo, 05508-270, São Paulo, SP, Brasile.

Abstract

The poultry production sector is tightly centred in Northern Italy, where chickens, turkey and other minor species are reared closely. Among the several well-known and managed respiratory issues, *avian Metapneumovirus* (aMPV) is growing as a concern also in chicken production, especially in broiler farming. Consistent data on its prevalence are lacking, so aMPV detections were summarized from longitudinal studies and diagnostic one-off samplings from Northern Italy from 2014 to 2016. The results demonstrated the wide circulation of aMPV subtype B and its presence in subsequent cycles in the same farm. aMPV sequences from chickens and turkeys showed high homology from the comparison, excluding a host-based strain separation. A field vaccination trial was also performed in two aMPV positive farms to verify the benefits of a subtype B-based vaccine administration in broilers, which appeared to fully control the clinical signs even if the persistence of a field strain was revealed in one of the farms.

INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus aviare* (aMPV) è l'agente eziologico della Rinotracheite del tacchino, caratterizzata da congiuntivite, scolo nasale, rantoli, starnuti e morbilità molto elevata nel tacchino da carne, mentre in riproduttori e ovaiole l'infezione è correlata ad un calo dell'ovodeposizione e ad alterazioni della qualità delle uova (Cook, 2000). Nel pollo, la Sindrome della testa gonfia (SHS) è considerata la conseguenza dell'interazione di aMPV e altri patogeni, principalmente *Escherichia coli*, manifestandosi con abbattimento, sintomatologia respiratoria, edema periorbitale che può estendersi a tutta la testa (Hafez, 1993). Il tradizionale ruolo di semplice agente predisponente o di cofattore (Cook, 2000) nelle problematiche respiratorie del broiler, è però messo in discussione dai numerosi episodi di sintomatologia attribuita unicamente ad aMPV. Sono infatti sempre maggiori le indicazioni di un possibile adattamento di aMPV all'ospite pollo o di una più marcata sensibilità di questi animali, date le numerose segnalazioni di manifesta sintomatologia clinica da infezione da aMPV sia in campo (Tucciarone et al., 2016) sia riprodotta in condizioni sperimentali (Moronato et al., 2016).

Altro interessante aspetto da considerare nell'esame della problematica sostenuta da aMPV nel pollo, è l'interazione con il *virus della Bronchite Infettiva* (IBV). A quest'ultimo è stata imputata un'azione competitiva da parte dei ceppi vaccinali e di

campo (Cavanagh et al., 1999, Cook et al., 2001) nei confronti dell'ingresso di aMPV e/o dalla protezione promossa dal vaccino. Episodi di coinfezione sono però stati documentati, soprattutto nella seconda metà del ciclo produttivo, sia in presenza di ceppi di IBV vaccinali sia di campo (Tucciarone et al., 2016).

In Europa risultano sempre più frequenti i report di aMPV nel pollo (Cecchinato et al., 2016, Franzo et al., 2017), in associazione o meno a sintomatologia, e anche in Italia non sono nuove le segnalazioni di aMPV in broiler, ovaiole e riproduttori (Cecchinato et al., 2013a, Cecchinato et al., 2012, Tucciarone et al., 2016), ma mancano dati organici sulla sua prevalenza e distribuzione nel nostro Paese.

Questo lavoro vuole fornire un quadro più chiaro dell'epidemiologia di aMPV nel broiler, attraverso studi longitudinali e attività diagnostica nel Nord Italia. Per verificare l'efficacia di strategie di controllo nei confronti di aMPV anche nel broiler, aggiuntive alle consuete misure di biosicurezza, si descrive inoltre una prova di vaccinazione, attuata in condizioni di campo in aziende in precedenza colpite da aMPV.

MATERIALI E METODI

Studi longitudinali e campioni diagnostici

Nel periodo dal 2014 al 2016 sono stati effettuati, nell'ambito di studi longitudinali e monitoraggi diagnostici, 313 campioni da 46 aziende distribuite nel Nord Italia. Ciascuno di questi era costituito da un pool di 10 tamponi orofaringei/tracheali per capannone. Per ogni campione sono state registrate le informazioni anamnestiche cliniche, l'età dei broiler, i protocolli di vaccinazione in atto per la Bronchite Infettiva, la data di campionamento, l'azienda e la localizzazione geografica. In nessuna delle aziende coinvolte nello studio erano previsti piani di vaccinazione contro aMPV.

Diagnostica molecolare per aMPV e IBV e analisi filogenetica

I campioni sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA virale con un kit commerciale (High Pure RNA Isolation Kit, Roche®, Mannheim, Germania). La presenza di aMPV è stata valutata mediante una multiplex Real Time RT-PCR (Cecchinato et al., 2013b), in grado di identificare e distinguere simultaneamente il sottotipo A e B. I campioni sono stati testati inoltre per IBV, mediante una RT-PCR generica (Cavanagh et al., 1999) e sequenziamento Sanger nella regione ipervariabile del gene S1 presso l'azienda Macrogen Europe (Amsterdam, Paesi Bassi). È stata effettuata la genotipizzazione dei ceppi identificati per differenziarne l'effettiva origine di campo o vaccinale (Franzo et al., 2014). In base alla vicinanza con aziende di tacchini e alla positività ad aMPV in cicli precedenti, sono stati selezionati tre campioni positivi (ID 92, 95, 104, del 2014) (Tabella 1) che, assieme a due campioni provenienti da aziende circostanti di tacchini, sono stati parzialmente (436 bp) amplificati e sequenziati nel gene G utilizzando il metodo descritto da Cecchinato et al. (2010). Le sequenze consenso ottenute sono state allineate a sequenze depositate di aMPV italiane ed europee e analizzate con il metodo Neighbor joining.

Valutazione dell'efficacia vaccinale in campo

Nel 2015 è stata predisposta una prova sperimentale di vaccinazione contro aMPV in due aziende di broiler che avevano segnalato in precedenza problematiche legate

a questo patogeno. Gli animali sono stati vaccinati a 12 giorni di vita con un vaccino basato su aMPV sottotipo B (ceppo VCO3) e monitorati settimanalmente tramite la raccolta di tamponi orofaringei, processati come descritto in precedenza. I campioni sono stati sottoposti a nested RT-PCR (Naylor et al., 1997) per la tipizzazione e sequenziati presso l'azienda Macrogen Europe (Amsterdam, Paesi Bassi). L'analisi filogenetica con metodo Neighbor joining è stata effettuata per distinguere l'origine di campo o vaccinale dei ceppi di aMPV amplificati.

RISULTATI

Ottanta (25,6%) campioni sono risultati positivi per aMPV, tutti appartenenti al sottotipo B e provenienti da 27 aziende (58,7%). In alcune di esse (3, 17 e 39) (Tabella 1), la presenza di aMPV è stata identificata per più cicli consecutivi. Nel 95% delle positività, gli animali possedevano un'età superiore ai 26 giorni (Figura 1) e nel 68,8% dei casi era presente sintomatologia respiratoria. I sintomi clinici erano associati per il 37,6% al solo riscontro di aMPV e per il 10,2% a IBV di campo. Tutti i campioni sono risultati positivi per IBV, il 91,7% ha rivelato la presenza di uno dei ceppi vaccinali utilizzati in azienda, mentre in 24 (7,7%) campioni è stato identificato il ceppo QX e in 2 (0,6%) il ceppo Q1. Solo nel 3,5% dei casi è stata accertata la compresenza di aMPV e IBV. Le analisi filogenetiche dei ceppi selezionati di aMPV e la comparazione con i ceppi provenienti da allevamenti di tacchino hanno dimostrato la perfetta identità tra le sequenze ottenute in questo studio e la divergenza rispetto ad altre sequenze italiane (Figura 2).

Durante la prova di vaccinazione in campo non è stata osservata sintomatologia clinica, anche in presenza di ceppi di campo identificati in tre dei quattro capannoni dell'azienda 1. Nell'azienda 2 è stato possibile sequenziare al 25° giorno post-vaccinazione (36 giorni di età) un solo ceppo, riconducibile al vaccino utilizzato (Tabella 2).

DISCUSSIONE

Questo studio ha permesso di aggiornare alcuni aspetti dell'epidemiologia italiana di aMPV nel broiler. aMPV sottotipo B si conferma un patogeno molto diffuso anche in questa specie, sempre più frequentemente associato alla presenza di sintomi respiratori. Nel Nord Italia, l'elevata vocazione avicola del territorio rende inevitabile la prossimità di allevamenti di specie diverse, quali broiler o tacchini. È quindi plausibile che aMPV diffonda da un settore all'altro, senza che la direzionalità del flusso sia nota. Dal punto di vista filogenetico infatti, la vicinanza delle sequenze provenienti dai due ospiti mette in luce un'evoluzione progressiva nel tempo, in assenza di *cluster* ospite-specifici. La presenza virale evidenziata in cicli consecutivi nella stessa azienda, denota la capacità del pollo da carne di assicurare condizioni di persistenza e diffusione del patogeno. La comparsa di aMPV dalla seconda metà del ciclo produttivo suggerisce infatti una precisa finestra temporale di maggiore sensibilità degli animali, probabilmente influenzata anche dalle condizioni di allevamento. Una maggiore sensibilità dell'ospite verso aMPV, potrebbe essere anche dimostrata dalla sua sempre più frequente identificazione assieme a IBV, sia di origine vaccinale sia di campo e per lungo tempo ritenuto elemento di ostacolo alla sua replicazione. Altresì, l'efficace controllo della BI tramite la vaccinazione potrebbe invece aver garantito un più ampio margine d'azione ad aMPV. Il suo ruolo epidemiologico nel pollo non risulta quindi trascurabile e sottolinea l'importanza di valutare, in aree "problema" a

causa dell'elevata pressione infettante, la possibile adozione di strategie di controllo. A tal proposito, la prova di vaccinazione in campo in aziende già colpite da aMPV, ha permesso la riduzione della presenza virale in una delle due aziende monitorate, mostrando la persistenza vaccinale del ceppo utilizzato nella stessa. Nell'altra azienda, pur in presenza di ceppi di campo, si è invece potuta verificare una chiara efficacia nella riduzione della sintomatologia clinica, indispensabile nel primo approccio di contenimento del problema e, di conseguenza, dell'impatto economico. Questo studio affronta quindi aspetti preliminari legati alla diffusione di aMPV nel settore dell'allevamento del broiler, la sua epidemiologia e circolazione nel Nord Italia e il potenziale delle opzioni di profilassi indiretta da estendere anche al pollo da carne, stimolando l'attenzione verso una problematica spesso sottovalutata.

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 Pathology* 28, 593-605.

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., Catelli, E., Lupini, C., Ricchizzi, E., Clubbe, J., Battilani, M., Naylor, C.J., 2010. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology* 146, 24-34.

Cecchinato, M., Ferreira, H.L., Munir, M., Catelli, E., 2016. 10 Avian Metapneumovirus. *Mononegaviruses of Veterinary Importance: Molecular Epidemiology and Control* 127.

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 Pathology* 42, 283-289.

Cecchinato, M., Lupini, C., Ricchizzi, E., Falchieri, M., Meini, A., Jones, R.C., Catelli, E., 2012. Italian field survey reveals a high diffusion of avian metapneumovirus subtype B in layers and weaknesses in the vaccination strategy applied. *Avian Diseases* 56, 720-724.

Cook, J., 2000. Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal* 160, 118-125.

Cook, J.K., Huggins, M.B., Orbell, S.J., Mawditt, K., Cavanagh, D., 2001. Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian Pathology* 30, 233-242.

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.

Franzo, G., Tucciarone, C.M., Enache, M., Patru, V., Ramon, G., Koutoulis, K.C., Cecchinato, M., 2017. First report of *avian Metapneumovirus* subtype B field strain in a Romanian broiler flock during an outbreak of respiratory disease. *Avian Diseases* (in press).

Hafez, H., 1993. The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review. *Arch.Geflugelkunde* 57, 181-185.

Moronato, M.L., Gobbo, F., Mainenti, M., Franzo, G., Cecchinato, M., Catelli, E., Catania, S., Martini, M., 2016. Infezione sperimentale con *Metapneumovirus aviare* e *Mycoplasma synoviae* in polli da carne: risultati preliminari. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria*, 218-221.

Naylor, C., Shaw, K., Britton, P., Cavanagh, D., 1997. Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathology* 26, 327-338.

Tucciarone, C.M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Cecchinato, M., 2016. Cinetica di ceppi vaccinali del virus della Bronchite Infettiva e interazioni con ceppi di campo e *Metapneumovirus aviare* in allevamenti di broiler. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria*, 252-260.

Azienda	Ciclo	Capannone	Età	Data	Caratterizzazione ceppo IBV	aMPV	Segni clinici	ID
1	-	1	39	18/06/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	320
3	1	1	13	16/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	16
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	17
		1	20	23/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	33
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	34
		1	27	30/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	35
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	36
	2	2	34	16/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	104
	3	1	38	08/01/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	165
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	166
	4	-	1	36	04/11/2015	Ceppo vaccinale	+	✓
2			Ceppo vaccinale			+	✓	377
8	-	1	47	19/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	362
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	366
		3			Q1	+	✓	370
10	-	2	35	03/03/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	509
		3			QX	+	✓	510
11	-	2	39	29/03/2016	QX	+	✓	535
12	-	5	45	31/08/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	336
		6			Ceppo vaccinale	+	✓	337
		7			Ceppo vaccinale	+	✓	341
13	-	5	32	29/09/2015	Ceppo vaccinale	+	✗	342
15	1	1	36	16/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	106
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	107
		2	44	24/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	108
		3			Ceppo vaccinale	+	✗	109

17	1	3	26	21/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	31
		3	40	04/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	38
		3	49	13/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	43
		2	50		Ceppo vaccinale	+	✗	44
	2	3	45	24/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	92
		4			Ceppo vaccinale	+	✗	93
	4	3	36	11/03/2015	Ceppo vaccinale	+	✗	223
-	3	54	01/04/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	247	
18	-	1	50	06/07/2015	QX	+	✓	330
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	331
19	-	1	49	12/01/2016	QX	+	✓	444
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	445
21	-	2	38	29/01/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	478
24	-	1	38	13/05/2016	QX	+	✓	611
		3			Ceppo vaccinale	+	✓	612
26	-	2	42	23/02/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	500
27	-	n.r.	42	19/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	372
29	-	n.r.	40	19/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	398
30	1	1	30	16/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	83
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	85
		1	38	24/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	86
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	87
		3			Ceppo vaccinale	+	✗	90
		1			45	31/10/2014	Ceppo vaccinale	+
32	-	2	41	07/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	359
		5			Ceppo vaccinale	+	✓	360
33	-	n.r.	36	24/02/2016	QX	+	✓	504
34	-	1	44	30/01/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	185
35	-	1	43	20/04/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	556
		2			QX	+	✓	557
		3			QX	+	✓	558

36	1	1	34	08/04/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	248
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	249
		3			Ceppo vaccinale	+	✓	250
		4			Ceppo vaccinale	+	✓	251
37	-	1	47	17/03/2016	QX	+	✓	541
39	1	1	42	08/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	40
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	41
		1	47	13/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	45
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	46
	2	2	45	27/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	95
	4	1	37	11/03/2015	Ceppo vaccinale	+	✗	220
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	221
	5	1	34	14/05/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	255
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	256
	44	1	2	32	20/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓
3			Ceppo vaccinale			+	✓	396
4			Ceppo vaccinale			+	✓	397
2		4	49	01/12/2015	QX	+	✓	405
-		2	50	23/03/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	530
		3			Ceppo vaccinale	+	✓	531
		4			Ceppo vaccinale	+	✓	532
46	1	2	43	01/02/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	192
	5	3	44	04/11/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	380

Tabella 1: Campioni aMPV positivi provenienti dagli studi longitudinali e dai monitoraggi diagnostici e informazioni anamnestiche e cliniche ad essi associate.

Azienda/ Capannone	Punto di campionamento	Età (gg)	Giorni post vaccinazione	Nested RT- PCR aMPV	Sequenziamento
Azienda 1/ Capannone 1	1	22	11	Negativo	n.p.
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
	4	43	32	aMPV/B	non tipizzato
Azienda 1/ Capannone 2	1	22	11	Negativo	n.p.
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
	4	43	32	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
Azienda 1/ Capannone 3	1	15	4	Negativo	n.p.
	2	22	11	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
	3	29	18	aMPV/B	non tipizzato
	4	36	25	aMPV/B	non tipizzato
Azienda 1/ Capannone 4	1	15	4	aMPV/B	non tipizzato
	2	22	11	Negativo	n.p.
	3	29	18	Negativo	n.p.
	4	36	25	Negativo	n.p.
Azienda 2/ Capannone 1	1	22	11	Negativo	n.p.
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	Negativo	n.p.
	4	43	32	Negativo	n.p.
Azienda 2/ Capannone 2	1	22	11	aMPV/B	non tipizzato
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	aMPV/B	Ceppo vaccinale
	4	43	32	Negativo	n.p.

Tabella 2: Schema di campionamento e risultati della prova di vaccinazione nei confronti di aMPV.

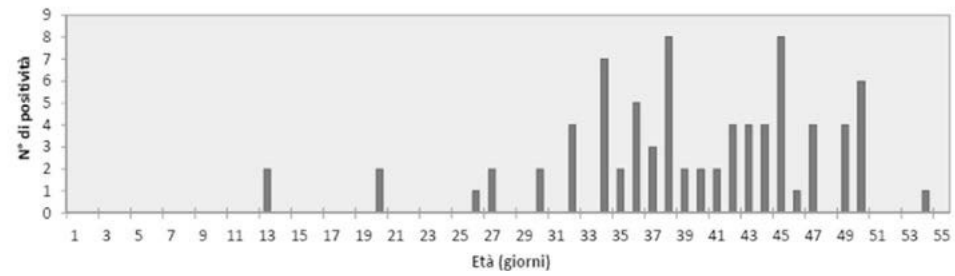
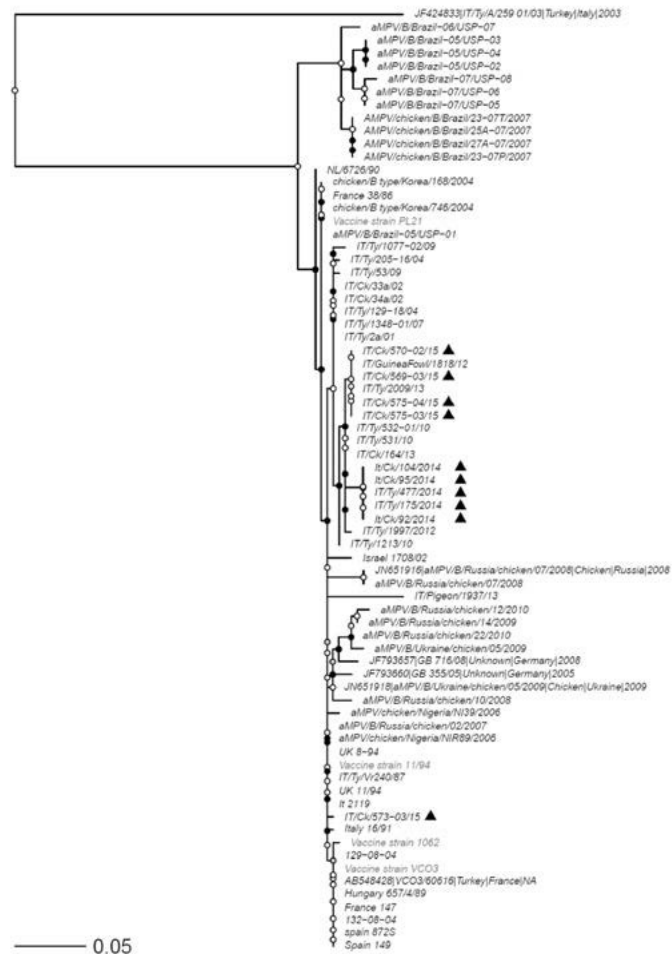


Figura 1: Distribuzione delle positività per aMPV in funzione dell'età degli animali.



INDICE DEGLI AUTORI

Figura 2: Albero filogenetico ricostruito con sequenze depositate e sequenze (identificate con un triangolo nero) provenienti da broiler, tacchini e dalla prova sperimentale ottenute in questo studio.



- Alessandri E. 25
- Battistoni F. 19
- Bellucci S. 4, 61
- Berto G. 135
- Bocciero R. 87, 141
- Bonfante F. 135
- Borrelli L. 75, 153
- Boscolo L. 135
- Brandão P. E. 163
- Calligarich C. 4, 101, 107, 113
- Camarda A. 21
- Casagrande Proietti P. 61
- Catania S. 69, 93, 131
- Catelli E. 41, 121, 157, 163
- Cecchettin K. 79
- Cecchinato M. 121, 157, 163
- Circella E. 21
- Colnago G. 4, 113
- Dall'Angelo A. 131
- Dalle Zotte A. 157
- De Luca Bossa L.M. 153
- De Luca S. 4, 61
- Di Francesco C.E. 147
- Di Giannatale E. 147
- Dipineto L. 75, 153
- D'Orazio S. 75
- Drago A. 79
- Facchetti G. 4, 113
- Fasoli P. 113
- Felice V. 157
- Ferrante V. 4, 113
- Ferrazzi V. 4, 107
- Fiorentini L. 87, 141
- Fioretti A. 75, 153
- Fontana I. 55
- Fortin A. 79
- Franciosini M.P. 4, 61
- Franzo G. 163
- Fregnani G. 87, 141
- Gargiulo A. 153
- Gobbo F. 69, 93
- Grilli G. 4, 101, 107, 113
- Guarneri P. 4, 101
- Guelfi G. 4, 61
- Guffanti P. 4, 113
- Laconi A. 121
- Leardini S. 79
- Listorti V. 121, 163
- Longoni C. 157
- Lupini C. 121, 157, 163
- Mainenti M. 69, 131
- Maniero S. 135
- Marciano S. 79
- Marsilio F. 147

Martini M. 163
 Massi P. 43, 87, 141
 Matucci A. 69
 Mazzetto E. 135
 Meini A. 135
 Menna L.F. 75
 Mescolini G. 163
 Mondella M. 4, 101
 Moreno Martin A. 33
 Moronato M.L. 93, 131

 Naylor C.J. 121

 Orsini M. 147

 Pace A. 75
 Pagnoni A. 4, 101
 Paone S. 153
 Parigi M. 87, 141
 Pasini G. 4, 113
 Picchi M. 69
 Pieramati C. 4, 61
 Pradella G. 4, 113
 Profeta F. 147

 Raia P. 153
 Rampa L. 153
 Recordati C. 157
 Rizzi S. 93
 Romano V. 75
 Romboli C. 87, 141
 Russo E. 157

Russo T.P. 75
 Salomoni A. 135
 Scacchia M. 147
 Scaravelli D. 87
 Scolari A. 27
 Stella S. 4, 107
 Stonfer M. 4, 101

 Tasoniero G. 157
 Terregino C. 79, 131, 135
 Tirloni E. 4, 107
 Tonellato F. 93
 Torres Alejo C. 163
 Toscani T. 147
 Tosi G. 87, 141
 Trapani A. 4, 107
 Tucciarone C. M. 163

 Vandì L. 141
 Varriale L. 75

 Zanardello C. 69, 131

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 gocce grosse. 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 28 ml per ogni 100 pulcini 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 dalla replicazione dovuta alle oocisti. Conservare il vaccino ad una temperatura compresa tra +2 e +8 °C, evitando 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 430669 - 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



I vaccini Huvepharma contro la coccidiosi

HuveGuard® MMAT

Eimeria maxima, Eimeria mitis, Eimeria acervulina e Eimeria tenella

HuveGuard® NB

Eimeria necatrix e Eimeria brunetti

Huvepharma EOOD
3^a Nikolay Haytov Str
1113 Sofia, Bulgaria
P +359 2 862 5331
F +359 2 862 5334
sales@huvepharma.com

Huvepharma N.V.
Uitbreidingstraat 1780
2600 Antwerp, Belgium
P +32 3 288 1849
F +32 3 289 7845
customerservice@huvepharma.com

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



POULTRY

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



VACCINAZIONE CONTRO LA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

Gallivac® IB88 NeO

LA COMPRESSA
EFFERVESCENTE
CHE SEMPLIFICA
LA VACCINAZIONE

GALLIVAC® IB 88 è ora disponibile in una nuova formulazione effervescente. Basta mettere una compressa di GALLIVAC® IB88 NeO in un recipiente con acqua e il tuo vaccino è pronto per l'uso: molto più semplice e **pratico** di prima, **affidabile** ed **eco-sostenibile***



DISPONIBILE IN 2 CONFEZIONI:

- 1 blister da 10 compresse da 1.000 dosi
- 1 blister da 10 compresse da 2.000 dosi

* Il nuovo confezionamento riduce il peso dei rifiuti prodotti di 10 volte rispetto ai tradizionali flaconi di vetro. La scatola di cartone è certificata FSC (Responsible Forest Management), inducendo un minore impatto sull'ambiente ("carbon foot print"). Il sito di produzione utilizza tecnologie su licenza di "Phibro Animal Health Corporation USA" e suoi affiliati. Gallivac® IB 88 è marchio registrato di Merial SAS.



Merial fa ora parte di Boehringer Ingelheim

VACCINI NEO: MIGLIORARE PER SEMPLIFICARE IL VOSTRO LAVORO!



LA RIVOLUZIONE NEL CONTROLLO DEL PIDOCCHIO ROSSO!

Exzolt™
FLURALANER

Exzolt, novità assoluta di MSD Animal Health è in grado di eliminare il 99,9 % della popolazione di pidocchio rosso, fornendo in pollastre, galline ovaiole e riproduttori la protezione di maggior durata dalla reinfezione*. La sua semplice somministrazione attraverso il sistema di abbeverata non richiede nuove attrezzature o personale specializzato ed una sola persona è ora in grado di trattare tutto l'allevamento più velocemente e semplicemente che mai.

* Data on file

MSD Animal Health S.r.l.
Via Fratelli Cervi s.n.c.
Centro Direzionale Milano Due
20090 Segrate (Milano)
02 516861

Pubblicazione riservata ai Sigg. Medici Veterinari e Farmacisti





BECAUSE LIFE IS BETTER LIVED TOGETHER

Noi siamo una cosa sola.
Siamo **LIVISTO**.

L'unificazione di tutti i nostri marchi aziendali nazionali nel nuovo brand globale **LIVISTO** consente ad **Industria Italiana Integratori TREI** Spa di ottimizzare le proprie attività.

Il nostro obiettivo primario è soddisfare le esigenze dei professionisti del settore veterinario, allevatori e proprietari di animali domestici.

Ora siamo più forti, lavoriamo insieme.

12 Aziende in
9 Paesi che operano con
500 dipendenti in
129 mercati con quasi
100 anni di storia

Il Gruppo **LIVISTO** sviluppa e commercializza un'ampia gamma di prodotti in segmenti chiave nel settore della salute animale.

Il portafoglio è composto da prodotti farmaceutici e nutrizionali di alta qualità per animali da reddito e domestici.



Along with you

www.livisto.com

SOLUZIONI DI OGGI PER PROBLEMI DI OGGI

VACCINI DIAGNOSTICI COCCIDIOSTATICI VACCINAZIONE IN-OVO

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

zoetis

Finito di stampare
nel mese di Settembre 2017
da La Ducale Srl - Parma