



**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARIA**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria  
2018**



**LVII CONVEGNO ANNUALE  
III SIMPOSIO SCIENTIFICO**

**Marmirolo (MN), 10-11 Maggio 2018  
Parma (PR), 14 Settembre 2018**

In copertina: **Windswept Rooster**, Arti Chauhan  
[www.artichauhanart.co.uk](http://www.artichauhanart.co.uk)

**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2018**

**Marmirolo (MN), 10-11 Maggio 2018**

**Parma (PR), 14 Settembre 2018**



## INDICE

Prefazione ..... pag. 17

### ATTI DEL LVII CONVEGNO ANNUALE

*Marmirolo (MN), 10-11 Maggio 2018*

#### INCONTRO

*“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sull’influenza aviare”*

- AGGIORNAMENTI EPIDEMIOLOGICI RIGUARDO I FOCOLAI DI INFLUENZA AVIARE IN ITALIA NEL 2017-2018  
*Calogero Terregino* ..... pag. 21
- CASI CLINICI 2017 ED ESPERIENZE DI CAMPO NELLE SPECIE AVICOLE  
*Salvatore Catania* ..... pag. 23
- CASI CLINICI 2017-2018 ED ESPERIENZE DI CAMPO  
*Giovanni Tosi, Massi Paola* ..... pag. 33
- RIFLESSIONI IN SEGUITO AL RISCONTRO DI RESIDUI DI CLORAMFE NICOLO IN UN ALLEVAMENTO DI SELVAGGINA  
*Alessandro Scolari* ..... pag. 37

#### CONVEGNO

*“Allevamento avicolo senza uso degli antibiotici:  
realità e prospettive”*

- PROCEDURES TO REAR ANTIBIOTIC-FREE CHICKENS IN POULTRY MEAT PRODUCTION  
*Dan Pearson* ..... pag. 55

- GESTIONE E PROBLEMATICHE DELL'ALLEVAMENTO AVICOLO ANTIBIOTIC-FREE NEGLI USA  
*David Heckman* ..... pag. 67
- ATTUALITÀ SULL'USO DEGLI ANTIBIOTICI NELL' ALLEVAMENTO AVICOLO ITALIANO: AZIONI INTRAPRESE E SVILUPPI FUTURI  
*Rossella Pedicone* ..... pag. 73
- NUOVI STRUMENTI DECISIONALI PER UN USO PRUDENTE DEGLI ANTIBIOTICI  
*Salvatore Catania* ..... pag. 75
- IL PUNTO DI VISTA DELLA GDO E LE ESIGENZE DEL CONSUMATORE  
*Carlo Ferrari* ..... pag. 77

**ATTI DEL III SIMPOSIO SCIENTIFICO SIPA**  
*Parma, 14 Settembre 2018*

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

- OCCURRENCE OF B-LACTAM RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM THE BROILER PRODUCTION CHAIN  
*Apostolakos I., Fasolato L., Cuccato M., Ferrareso J., Rizzo R., Zago M., Piccirillo A.* ..... pag. 87
- ELEVATA MORTALITÀ IN RIPRODUTTORI DI GALLINA FARAONA ASCRIVIBILE AD INTOSSICAZIONE DA ALOFUGINONE  
*Bottinelli M., Mainenti M., Paladino A., Zanardello C., Pozzato N., Catania S.*.....pag.93
- CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FILOGENETICA DI *ESCHERICHIA COLI* ESBL-PRODUTTORI ISOLATI DA POLLO  
*Brunetta R., Zandonà L., Bano L., Drigo I., Mazzolini E., Andreatta S., Catania S., Cocchi M., D'Este L., Pozzato N., Trevisiol K., Agnoletti F.*..... pag. 97
- COMPARAZIONE DEI PROFILI DI FARMACONSENSIBILITÀ DI *ESCHERICHIA COLI* ED *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLATI DA POLLI DA CARNE ALL'INIZIO E ALLA FINE DEL CICLO PRODUTTIVO  
*Cauci C., Brunetta R., Di Martino G., Zandonà L., Dalla Costa A., Capello K., Stefani A.L., Moronato M.L., Gobbo F., Catania S., Bano L., Bonfanti L.*.....pag. 105

- EFFICACIA DI RP03® PER IL CONTROLLO DELLE INFESTAZIONI DA *DERMANYSSUS GALLINAE* IN ALLEVAMENTI AVICOLI  
*Cocciolo G., Circella E., Giangaspero A., Bevilacqua A., Gradoni L., Previtera I., Camarda A.*.....**pag. 113**
  
- PICCOLI CAMBIAMENTI, GRANDI BENEFICI: INDAGINE DELL'EFFETTO DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA E DEL METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN GRECIA  
*Franzo G., Tucciarone C.M., Andreopoulou M., Prentza Z., Koutoulis K.C., Legnardi M., Chaligiannis I., Cecchinato M.*.....**pag. 121**
  
- ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI CIRCOLANTI IN ITALIA  
*Lupini C., Mescolin G., Alastra G., Silveria F., Felice V., Catelli E.* .....**pag. 131**
  
- INDAGINE DI CAMPO SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS IMMUNOSOPPRESSIVI NEL POLLO DA CARNE  
*Lupini C., Mescolini G., Quaglia G., Silveira F., Felice V., Catelli E.*.....**pag. 135**
  
- ANALISI FILOGENETICA DI CEPPI DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE CIRCOLANTI IN EUROPA  
*Mescolini G., Franzo G., Lupini C., Cecchinato M., Tucciarone C.M., Felice V., Blanco A., Biarnes M., Legnardi M., Silveira F., Catelli E.* .....**pag. 141**
  
- CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPPO DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK RILEVATO IN TACCHINI DA CARNE CON FORMA VISCERALE  
*Mescolini G., Silveira F., Lupini C., Felice V., Fiorentini L., Tosi G., Massi P., Cecchinato M., Catelli E.*.....**pag. 147**
  
- INDAGINE SULLA PRESENZA DI *MYCOPLASMA SPP.* NELL'AVIFAUNA SELVATICA: RISULTATI PRELIMINARI  
*Moronato M.L., Fincato A., Boscarato M., Tonellato F.R., Catania S., Gobbo F.*.....**pag. 153**
  
- IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DI *CAMPYLOBACTER SPP.* ISOLATI DA EPISODI DI EPATITE VIBRIONICA AVIARE (AVH) / *SPOTTY LIVER DISEASE* (SLD) DEL BROILER E DELLA GALLINA OVAIOLA  
*Piccirillo A., Zandonà L., Carraro L., Apostolakos I., Bano L.*.....**pag. 161**
  
- EVIDENZA DI CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO C IN UN FISCHIONE (*ANAS PENOLOPE*) CAMPIONATO IN NORD ITALIA  
*Silveira F., Lupini C., Cecchinato M., Franzo G., Tucciarone C.M., Mescolini G., Felice V., Martini M., Terregino C., Catelli E.*.....**pag. 167**

- MICOBATTERIOSI AVIARE: QUADRI ANATOMO-PATOLOGICI A CONFRONTO  
*Tonellato F. R., Moronato M.L., Zanardello C., Sturaro A., Catania S., Gobbo F.*.....**pag. 173**
  
- CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA *EIMERIA TENELLA*, *EIMERIA MAXIMA* ED *EIMERIA ACERVULINA* IN POLLI DA CARNE MEDIANTE L'IMPIEGO DI UN' ASSOCIAZIONE TRIMETOPRIM+SULFADIMETOSSINA (RAPPORTO 1:5)  
*Tosi G., Fiorentini L., Parigi M., Fregnani G., Benedetti V., Leotti G., Ostanello F., Massi P.*.....**pag. 179**
  
- GENOTIPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE CIRCOLANTI NEGLI ALLEVAMENTI AVIARI NEL 2018  
*Trogu T., Faccin F., Canziani S., Lelli D., Sozzi E., Lavazza A., Moreno A.*.....**pag. 185**
  
- VALUTAZIONE DELLA CINETICA DI CEPPI VACCINALI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA SOMMINISTRATI VIA GEL A BROILER DI UN GIORNO DI VITA  
*Tucciarone C.M., Franzo G., Bianco A., Legnardi M., Berto G., Ramon G., Paulet P., Koutoulis K.C., Drigo M., Cecchinato M.* .....**pag. 191**

## POSTER

- *CAMPYLOBACTER* SPP. E SELVAGGINA DA PENNA  
*Borrelli L., Varriale L., Pace A., Russo T.P., Gargiulo A., Fioretti A., Dipineto L.* **pag. 203**
  
- IMPATTO DELL'APPLICAZIONE DI UNA MAPPA DI RISCHIO INTRODUZIONE DI INFLUENZA AVIARIA SULL'ALLEVAMENTO AVICOLO ALL'APERTO DELL'EMILIA-ROMAGNA  
*Santi A., Galletti G., Procopio A., Di Nardo S., Romanelli C., Loli Piccolomini L., Tamba M.* .....**pag. 207**

**INDICE DEGLI AUTORI**.....**pag. 213**



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

 **Boehringer  
Ingelheim**

La scheda tecnica è disponibile per la consultazione presso l'Ufficio Tecnico Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A.  
Via Lorenzini, 8 - 20139 Milano • Tel. 02.5355821  
Titolare A.I.C. Merial S.a.S.

\* 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.

**VACCINI NEO: MIGLIORARE PER SEMPLIFICARE IL VOSTRO LAVORO!**



*Together, beyond animal health*



# L'INNOVAZIONE PER IL TUO SUCCESSO INIZIA DALL'INCUBATOIO

Il nostro impegno  
per l'industria avicola

OVUNQUE CI PORTI IL FUTURO  
GARANTIAMO LA LORO SALUTE



TERAPIE  
FARMACEUTICHE

SUPPORTI  
FUNZIONALI

SOLUZIONI  
ANTIBIOTIC-FREE

 **chemifarma**<sup>®</sup> S.p.A.  
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

# L'Uniformità è Importante



Una uniformità prevedibile è un valore aggiunto per i vostri affari

- Costanza nel range di peso dei prodotti
- Broiler con la migliore uniformità
- Valori maggiori di resa
- Più alta % di carne di 1a qualità
- Profitti aumentati



# HALAMID

IL DISINFETTANTE UNIVERSALE

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

La biosicurezza inizia da una disinfezione efficace.

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

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

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

*Avere cura è molto più che curare.*

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

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



# AVLOSIN<sup>®</sup>

## IL MACROLIDE DEL FUTURO PER L'AVICOLTURA MODERNA



0 giorni di  
sospensione  
per le uova!

- ✓ Assorbimento più rapido
- ✓ Maggiore **biodisponibilità**
- ✓ Migliora l'**immunità innata**
- ✓ Effetto **micoplasmicida**
- ✓ **Efficace** contro **ceppi resistenti**
- ✓ Attività **intra ed extracellulare**
- ✓ Trattamento **breve: 3 giorni**
- ✓ **Basso dosaggio** terapeutico
- ✓ **Minore quantità** di antibiotico

Per maggiori informazioni consultare il foglietto illustrativo.

# LA SOLUZIONE ELANCO A 360°

AviPro.  
SALMONELLA VACE

AviPro.  
SALMONELLA VACT

AviPro.  
SALMONELLA DUO

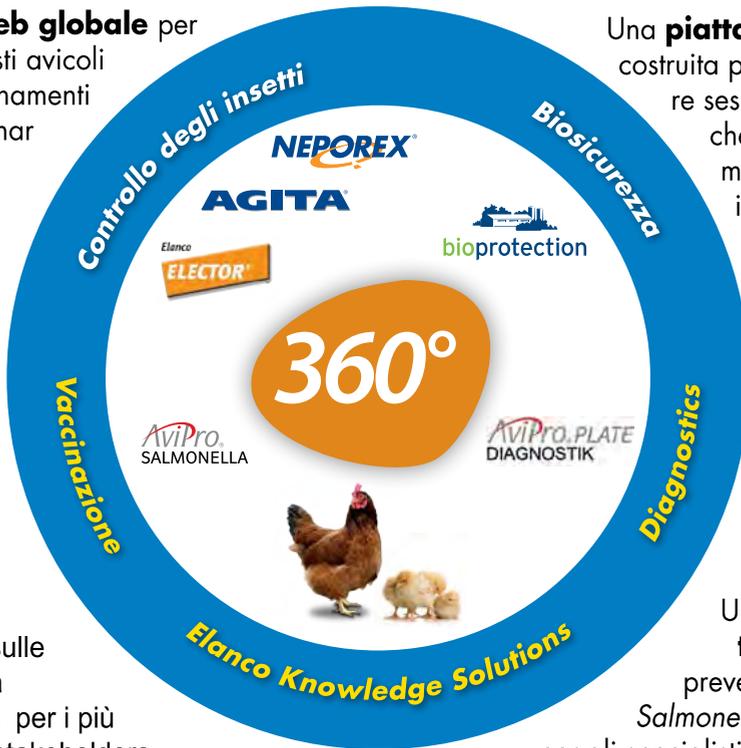


Salmonella 360°.com

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 ITLAYVP00001

**Elanco**

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2018 sono realizzate grazie al contributo di:

- AVIAGEN Italia
- BAYER Sanità animale
- BOEHRINGER INGELHEIM
- CEVA Salute animale
- CHEMIFARMA
- COBB
- DOX AL ITALIA
- ECUPHAR
- ELANCO Animal Health
- FATRO
- HIPRA
- HUVEPHARMA
- IZO
- MSD Animal Health
- ZOETIS Italia



## PREFAZIONE

Come consuetudine, pubblichiamo gli Atti del LVII Convegno nazionale e del III Simposio Scientifico. Il convegno nazionale, tenutosi quest'anno a Marmirolo (MN) il 10 e 11 maggio nella splendida cornice quattrocentesca di Villa Corte Peron, ha affrontato temi di estrema attualità.

Purtroppo il 2017 e gli inizi del 2018 hanno visto il territorio del nord Italia ancora interessato da episodi di influenza aviaria e quindi è stato chiesto al Dott. Terregino, direttore del Centro di Referenza Nazionale per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle dell'IZSVE, di Padova di presentare una relazione di aggiornamento sugli aspetti epidemiologici di questa importante patologia. Di seguito sono state presentate delle interessanti relazioni su casi clinici o su situazioni particolari che hanno visto coinvolto direttamente i vari relatori: Dott. Salvatore Catania (IZSVE, Verona), Dott. Alessandro Scolari (Laboratorio Vallerana, Cremona), Dott.ssa Paola Massi e Dott. Giovanni Tosi (IZSLER, Forlì).

SIPA è impegnata, ormai da alcuni anni, ad appoggiare Unaitalia nel promulgare e sviluppare il "Piano nazionale per l'uso responsabile del farmaco veterinario e per la lotta all'antibiotico-resistenza in avicoltura" e ci sembrava coerente con questo impegno organizzare il prosieguo del convegno dell'11 maggio coinvolgendo numerosi relatori che hanno affrontato, sotto diversi aspetti, l'argomento della giornata che era *"Allevamento avicolo senza uso degli antibiotici: realtà e prospettive"*.

Dopo i saluti di rito i primi relatori, il Dott. Dan Pearson (GB - Aviagen veterinary health director, Europe) e il Dott. David Heckman (Elanco, Usa), hanno presentato la realtà avicola a basso utilizzo di antimicrobici nei Paesi europei e negli USA; successivamente le relazioni hanno visto impegnati la Dott.ssa Rossella Pedicone (Unaitalia) che ha presentato le azioni intraprese e gli sviluppi futuri dei piani di riduzione degli antimicrobici negli allevamenti avicoli nazionali. Successivamente il Dott. Salvatore Catania (IZSVE, Verona) ha relazionato sui nuovi strumenti decisionali per un uso prudente degli antibiotici e il Dott. Carlo Ferrari (Responsabile Assicurazione Qualità del settore Carne, Esselunga) sul punto di vista della GDO e le esigenze del consumatore. La conclusione del convegno è toccata al Dott. Loris Alborali (IZSLER, Brescia) che ha presentato il sistema Classyfarm, prossimo strumento di verifica e controllo sull'uso degli antimicrobici ma anche di valutazione del benessere e delle norme di biosicurezza.

Naturalmente da parte di tutti noi vanno i ringraziamenti per i relatori.

Durante il convegno si è tenuta anche l'elezione del nuovo Consiglio Direttivo e del Presidente;

dopo 9 anni di Presidenza e 6 da segretario mi permetto di ringraziare in particolare i "miei" segretari, Alessandra Piccirillo e Mattia Cecchinato, nuovo presidente, nonché il "mio" impareggiabile vicepresidente Davide Giovanardi e tutti i consiglieri che si sono avvicendati al mio fianco in questi anni.

In questo commiato non posso certo dimenticare le Aziende e Società private che con i loro sforzi sono sempre state pronte ad appoggiarmi, anche economicamente, nell'organizzare tutti gli eventi che si sono susseguiti in questi anni e che qui pubblicamente ringrazio.

Un particolare ringraziamento va a Pietro e Giorgia Montanari nonché a Lilia Maccagnoni e Francesca Corona per la pazienza e la collaborazione mostrata in questi anni e che spero duri ancora per molto tempo.

Infine formulo i migliori auguri di buon lavoro ai nuovi eletti del consiglio direttivo e al nuovo Presidente, che dovrà affrontare il gravoso compito di organizzare il convegno mondiale del 2021.

Per ultimo invio un caro saluto ed un ringraziamento a tutti i soci per l'amicizia e la collaborazione che mi hanno sempre mostrato appoggiando le nostre iniziative.

Milano, 02 luglio 2018

*Dott. Guido Grilli*

*Presidente SIPA*

ATTI DEL LVII CONVEGNO ANNUALE

## **INCONTRO**

**“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sull’Influenza aviaria”**

Marmiolo (MN), 10-11 Maggio 2018



## **AGGIORNAMENTI EPIDEMIOLOGICI RIGUARDO I FOCOLAI DI INFLUENZA AVIARE IN ITALIA E IN EUROPA NEL 2017 E NEI PRIMI SEI MESI DEL 2018**

Terregino C.

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

### **Situazione in Italia nel 2018**

Nel 2018 (primo semestre) episodi di influenza aviare ad alta patogenicità (HPAI) si sono registrati a marzo in Lombardia:

1° Focolaio – Martinengo (Bergamo)

- Galline ovaiole
- Data di conferma: 2 Marzo

2° Focolaio – Coccaglio (Brescia)

- Galline ovaiole
- Data di conferma: 8 Marzo

3° Focolaio – Colonio Al Serio (Bergamo)

- Tacchini da carne
- Data di conferma: 12 Marzo

In data 28 marzo il Centro di Referenza Nazionale per Influenza Aviaria e Malattia di Newcastle ha confermato una nuova positività per virus influenzale sottotipo H5 a bassa patogenicità in un piccolo allevamento multi-specie in provincia di Milano. La positività è stata confermata nell'ambito delle attività di sorveglianza per influenza aviaria. Nessuna sintomatologia clinica era stata riscontrata.

### **Situazione in Europa nel 2018**

In Europa (Regno Unito, Irlanda, Germania, Finlandia, Slovacchia, Danimarca, Olanda, Svezia) si sono registrati nel primo semestre alcuni rinvenimenti di virus HPAI appartenenti prevalentemente al sottotipo H5N6 nei uccelli acquatici selvatici (circa 55 casi). Sporadiche segnalazioni di casi negli uccelli domestici (rurali per lo più) dovuti a questo sottotipo sono state segnalate in Olanda, Germania e Svezia.

Focolai di virus HPAI H5N8 (8 casi) sono stati segnati nel pollame in Bulgaria.

La circolazione di virus LPAI di sottotipo H5 è stata segnalata in Francia (15 casi) e in Danimarca (1 caso).

### **Riepilogo della situazione nel 2017**

In Italia nel 2017 si sono avuti 83 focolai da HPAI H5N8 nel pollame (tacchini da carne e ovaiole in particolare):

- 47 in Lombardia
- 27 in Veneto
- 5 in Emilia Romagna
- 2 in Piemonte
- 1 in Friuli Venezia Giulia
- 1 in Lazio

Sono stati ufficialmente registrati 14 casi negli uccelli selvatici (anatidi in particolare) da virus HPAI H5N8 e H5N5:

- 4 in Friuli Venezia Giulia
- 4 in Lombardia
- 3 in Piemonte
- 2 in Emilia Romagna
- 1 in Veneto

In molti casi si è trattato di allevamenti situati in prossimità di zone umide con presenza di volatili selvatici e quindi probabili introduzioni separate del virus dalla popolazione selvatica.

In alcuni casi, nelle aree densamente popolate di pollame (DPPA), c'è stata una diffusione del virus tra allevamenti epidemiologicamente collegati soprattutto nelle province di Brescia e Cremona. Alla base di questi casi secondari ci sono stati: condivisione di personale e automezzi e stretta vicinanza con i focolai primari.

In Europa nel 2017 si sono avuti circa 2.200 focolai con oltre dieci milioni di volatili morti o abbattuti (di cui circa 3.100 selvatici) dovuti a virus HPAI appartenenti al sottotipo H5 (H5N8, H5N5, H5N6).

### **Provvedimenti nazionali**

Il Dispositivo Dirigenziale DGSAF n. 4122 del 19 febbraio con il quale si applicavano le misure di riduzione del rischio (divieto di allevare il pollame all'aperto, di concentrazioni di pollame in occasione di fiere, mercati, mostre e di utilizzo di uccelli da richiamo degli ordini Anseriformi e Caradriformi, regolamentazione degli accasamenti e delle movimentazioni, sistemi di individuazione precoci) e di biosicurezza, è stato in vigore fino al 30 giugno 2018.

Dal primo luglio 2018 sono entrate in vigore le misure di riduzione del rischio e di biosicurezza indicate nella nota del Ministero della Salute prot. n. 15757 del 27/06/18 con la quale si raccomanda l'applicazione su tutto il territorio nazionale delle misure di polizia veterinaria contenute nell'O.M. 26 agosto 2005, prorogata da ultimo con l'O.M. 13 marzo 2017.

### **Attività di sorveglianza straordinaria nell'avifauna selvatica**

Grazie al finanziamento ottenuto con il DM del 14.03.2018 sono state programmate una serie di attività di sorveglianza straordinaria nell'avifauna in collaborazione con l'Istituto Superiore di Protezione e Ricerca Ambientale (ISPRA) e associazioni venatorie al fine di valutare con maggior precisione il rischio di diffusione di virus influenzali dal serbatoio selvatico al pollame.

#### ***Attività previste in estate 2018***

Identificazione di siti di aggregazione di uccelli selvatici nelle DPPA;

Identificazione delle specie residenti importanti per il mantenimento dei virus influenzali nei periodi di non svernamento;

Sorveglianza attiva nei siti riproduttivi di Anatidi, Ardeidi (aironi) e Laridi (gabbiani) mediante tamponi orofaringei /cloacali e raccolta feci (*fecal dropping*).

#### ***Attività previste nell'inverno 2018-19***

Sorveglianza attiva negli uccelli migratori abbattuti durante la stagione venatoria e raccolta di feci in siti specifici lungo le rotte migratorie.

Sono previste inoltre analisi genetiche approfondite attraverso metodica di Whole Genome Sequencing (WGS) sui virus identificati al fine di trovare le correlazioni con i virus responsabili di focolai nel pollame.

# CASI CLINICI 2017 ED ESPERIENZE DI CAMPO NELLE SPECIE AVICOLE

Catania S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTI Verona-Vicenza,  
via San Giacomo 5, 37157 Verona (VR), Italy*

Casi clinici

Salvatore Catania  
Laboratorio Medicina Aviare

LVII Convegno Annuale SIFA  
Mammolo, 30 Maggio 2018



● **Introduzione**

- Condivisione di alcuni casi clinici occorsi piuttosto frequentemente in polli e tacchini da ingrasso, in cui è possibile rilevare interessanti similitudini.
- Stimolare una discussione su un problema che in questi ultimi tempi ha mostrato una recrudescenza



● **Caso/i clinico broiler**

- Paraparesi o paralisi bilaterale (riportata in precedenza tra le 5-8 weeks)
- Alterazione alla deambulazi



Salvatore Catania, IZSV, 30 Maggio 2018

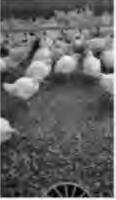
● **Caso/i clinico broiler**

- Conseguente ritardo nella crescita

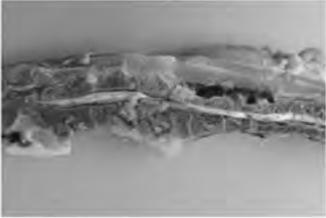


Salvatore Catania, IZSV, 30 Maggio 2018

● **Sintomatologia**



Salvatore Catania, IZSV, 30 Maggio 2018

● 

Salvatore Catania, IZSV, 30 Maggio 2018

- Patogenesi ... o almeno ipotesi ed evidenze ad oggi presenti

- Stress meccanici in questi particolari distretti anatomici
- Fattori predisponenti (genetiche a rapido accrescimento, sesso, HT eggs, alimentazione, salute intestinale...)
- Osteocondrosi dissecante (OCD) risulta essere considerato il *primum movens* su cui poi si localizza il batterio/1 (> è l'incidenza ed il grado di OCD > è la probabilità di sviluppare la sporidite da enterocchi)



- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 20 giorni



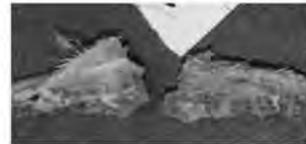
10

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 20 giorni



11

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 20 giorni



12

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 20 giorni



13

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 20 giorni



14

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 23 giorni



© Università Cattolica del Sacramento, 12 maggio 2014

17

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 23 giorni (sintomatologia monolaterale)



© Università Cattolica del Sacramento, 12 maggio 2014

18

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 23 giorni



© Università Cattolica del Sacramento, 12 maggio 2014

19

- Sintomatologia, pulcino 7 giorni



© Università Cattolica del Sacramento, 12 maggio 2014

20

- Risultato microbiologico

• *Enterococcus cecorum*



© Università Cattolica del Sacramento, 12 maggio 2014

21

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 17 giorni



© Università Cattolica del Sacramento, 12 maggio 2014

22

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 17 giorni



Università degli Studi di Perugia - 2014

- Lesioni macroscopiche rilevate soggetti di 17 giorni



Università degli Studi di Perugia - 2014

20

## Risultato microbiologico

- *Streptococcus gallolyticus*



Università degli Studi di Perugia - 2014

## Riprendiamo la patogenesi .....

- Stress meccanici in questi distretti particolari distretti anatomici
- Fattori predisponenti (genetiche a rapido accrescimento, sesso, HT eggs, alimentazione, salute intestinale...)
- Osteocondrosi dissecante (OCD) risulta essere considerato il *primus movens* su cui poi si localizza il batterio (> è l'incidenza ed il grado di OCD > è la probabilità di sviluppare la spodilite da enterococchi)
- La fase setticemica/batteriemia determina la colonizzazione dei tessuti con conseguente infiammazione, la manifestazione clinica del problema è quindi frutto di un problema in avanzato stato di sviluppo



Università degli Studi di Perugia - 2014

## Caso/i clinici Tacchino

- Consistenza gruppi (3) da 10.000 fino a 24.000
- Gruppi nella norma, dati di chiusura buoni, peso > 21kg.
- Mortalità cumulativa da 8.5% ad 11.5%
- Rilevata enterite in tutti i gruppi intorno alla terza settimana che si è protratta
- In un gruppo passaggio TRT con sintomatologia
- In un ulteriore gruppo mortalità da *Riemerella anatipestifer* a 14 settimane (circa 100 soggetto su 10000) ottima e pronta risposta al trattamento



Università degli Studi di Perugia - 2014

## Sintomatologia: casi clinici Tacchino

- A partire orientativamente dalla 11/12 settimana una piccola ma costante percentuale di animali presentava alterazioni locomotorie
- Animali zoppicanti, fermi riluttanti al movimento, questi vengono a morte per lesioni traumatiche
- Se gestiti in infermeria nessun recupero funzionale ma lento e progressivo peggioramento con mantenimento delle grandi funzioni organiche



Università degli Studi di Perugia - 2014

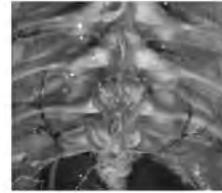
Lesioni macroscopiche rilevate



Intensitas Curiae, Murriano 13 maggio 2014

108

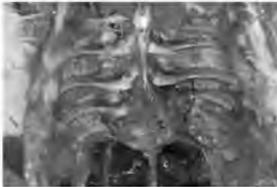
●



Intensitas Curiae, Murriano 13 maggio 2014

109

Lesioni macroscopiche rilevate



Intensitas Curiae, Murriano 13 maggio 2014

110

●

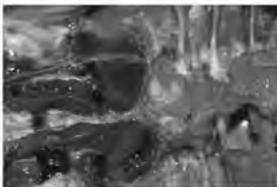
Lesioni macroscopiche rilevate



Intensitas Curiae, Murriano 13 maggio 2014

111

Lesioni macroscopiche rilevate

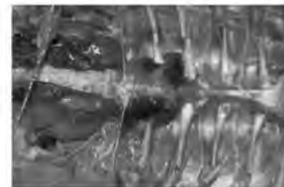


Intensitas Curiae, Murriano 13 maggio 2014

112

●

Lesioni macroscopiche rilevate



Intensitas Curiae, Murriano 13 maggio 2014

113

● Lesioni macroscopiche rilevate



Guidelines for the diagnosis and management of lung cancer

2018

● Lesioni macroscopiche rilevate



Guidelines for the diagnosis and management of lung cancer

2018

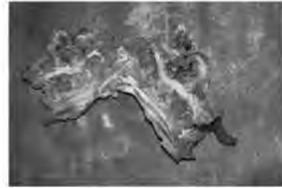
● Lesioni macroscopiche rilevate



Guidelines for the diagnosis and management of lung cancer

2018

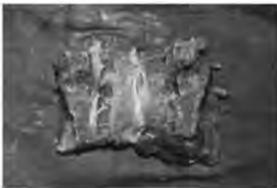
● Lesioni macroscopiche rilevate



Guidelines for the diagnosis and management of lung cancer

2018

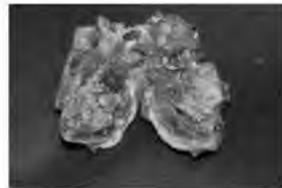
● Lesioni macroscopiche rilevate



Guidelines for the diagnosis and management of lung cancer

2018

● Lesioni macroscopiche rilevate



Guidelines for the diagnosis and management of lung cancer

2018

Lesioni macroscopiche rilevate



Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Lesioni macroscopiche rilevate



Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Lesioni macroscopiche rilevate



Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



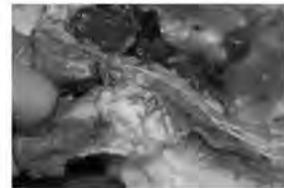
Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

- Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



 © Istituto G. Pini, Università G. Pini, 2009

- Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



 © Istituto G. Pini, Università G. Pini, 2009

- Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



 © Istituto G. Pini, Università G. Pini, 2009

- Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



 © Istituto G. Pini, Università G. Pini, 2009

- Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



 © Istituto G. Pini, Università G. Pini, 2009

- Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



 © Istituto G. Pini, Università G. Pini, 2009

## Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



## Lesioni macroscopiche rilevate: particolarità



## Risultato microbiologico

- *Riemerella anatipestifer*
- *Ornithobacterium rhinotracheale* (*Staphylococcus* coag pos. articolazioni)



## Patogenesi (andiamo in prestito dal pollo)

- Stress meccanici in questi distretti particolari distretti anatomici
- Fattori predisponenti (genetiche a rapido accrescimento, sesso, HT eggs, alimentazione, salute intestinale...)
- Osteocondrosi dissecante (OCD) risulta essere considerato il *primum movens* su cui poi si localizza il batterio, probabile ma non dimostrato



## Un punto di vista differente.....

- Una recrudescenza della problematica sia nella specie pollo che nella specie tacchino
- La fase setticemica/batteriemia determina la colonizzazione dei tessuti con conseguente infiammazione, la manifestazione clinica del problema è quindi frutto di un problema in avanzato stato
- Le specie batteriche coinvolte hanno sicuramente un ruolo nel processo infiammatorio, ma vista la loro variabilità occorrerà valutare i fattori che determinano o favoriscono processi osteocondrotici
- Attività focalizzate a limitare la batteriemia nel primo periodo di vita e favorire il corretto sviluppo scheletrico limitando fenomeni osteocondrotici



## Un punto di vista differente.....



## Conclusione

- Come in tutte le malattie multifattoriali le varie componenti (alimentare, genetica, infettiva, ambientale, strutturale ect ) devono essere correttamente ponderate al fine di apportare le misure gestionali più adeguate al fine produttivo
- Vista l'evoluzione dell'industria avicola le sfide future avranno sempre più problematiche multifattoriali di complessa soluzione...
- Il lavoro di sicuro non mancherà



**grazie  
per la vostra attenzione**



## CASI CLINICI 2017 ED ESPERIENZE DI CAMPO

### CASI CLINICI 2018 - IZSLER FORLI

Tosi G.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione Diagnostica di Forlì – Via Don Eugenio Sservadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC). [giovanni.tos@izsler.it](mailto:giovanni.tos@izsler.it)*

Vengono di seguito descritte le patologie che per incidenza e gravità hanno meritato, nel corso dei primi mesi del 2018, un'attenzione particolare e dettagliati approfondimenti diagnostici.

- 1) **Sindromi da malassorbimento:** la patologia è nota da molto tempo ma nel corso degli ultimi mesi (in particolare durante il periodo invernale) si è assistito ad un sensibile incremento del numero dei casi osservati, sia nel pollo da carne che nelle linee leggere. L'età di comparsa dei segni clinici era compresa tra 7 e 14 giorni. I gruppi colpiti manifestavano una marcata difformità di sviluppo associata a riduzione dei consumi di alimento e a depressione del sensorio. In alcuni casi si osservavano le tipiche alterazioni del piumaggio. L'esame anatomico-patologico rivelava la presenza di un quadro enterico caratterizzato da un assottigliamento della parete intestinale e da una riduzione della consistenza del contenuto intestinale che, in particolare nei ciechi, si presentava fluido frammisto a bolle di gas. In alcuni casi il quadro enterico era associato a proventriculite. Gli esami di laboratorio confermavano la presenza di virus enterici, spesso associati ad infezioni batteriche da *Escherichia coli* e da enterococchi. Tra le forme virali maggiormente isolate negli ultimi tempi spicca la presenza del virus della nefrite virale aviaria (ANV), un astrovirus la cui patogenicità è ancora oggetto di studio ma che, nei gruppi colpiti, sembra essere associato ad una maggiore gravità dei segni clinici e delle conseguenze sulle performance produttive. Di particolare rilievo appare inoltre la possibilità di isolare ANV mediante l'inoculazione di uova embrionate di pollo SPF, in modo da poter disporre di ceppi replicanti per poter condurre indagini di tipo epidemiologico e patogenetico. Tra i casi osservati negli ultimi mesi va segnalato un quadro di malassorbimento (con isolamento di ANV) in un gruppo di pollastre. I primi segni clinici venivano osservati a 14 giorni di età e peggioravano progressivamente nelle settimane seguenti in virtù del concomitante isolamento di virus ad attività immunodepressiva quali bursite infettiva del pollo (IBDV) e anemia infettiva del pollo (CIAV). Complessivamente, nel gruppo colpito, la mortalità superava il 10%. È interessante notare come, nell'allevamento-problema, i tre gruppi colpiti avessero diverse età di accasamento e soprattutto provenissero da gruppi diversi di riproduttori. La trasmissione verticale di ANV (così come di altri virus enterici) è ancora oggetto di discussione in ambito scientifico. Non si tratta ovviamente di una trasmissione transovarica, ma di una pos-

sibile contaminazione fecale del guscio. In ogni caso, senza escludere la possibile origine dei virus enterici dai gruppi da riproduzione, sembra in molti casi (come ad esempio in quello osservato) che la loro diffusione sia legata a carenze igienico-sanitarie e gestionali nei gruppi colpiti.

- 2) **Spondilite enterococcica**: è considerata una delle principali malattie emergenti negli ultimi anni nelle linee pesanti. Negli ultimi tre anni si è assistito ad un progressivo aumento dell'incidenza di questa patologia causata da enterococchi (in particolare da *Enterococcus cecorum*) denominata "bacterial chondronecrosis with osteomyelitis" (BCO). Si stima che circa l'1% di tutti i polli da carne attualmente allevati siano affetti dalla patologia che in genere si manifesta clinicamente a partire dalle 5 settimane di età. Sulla base delle attuali conoscenze riguardanti l'epidemiologia e la patogenesi della BCO si ipotizza che il rapido accrescimento delle linee genetiche allevate (unito a situazioni di stress meccanico a carico degli arti) determini un'alterazione delle cartilagini epifisarie (soprattutto a livello di femore, tibia e vertebre toraciche) successivamente colonizzate da ceppi batterici rappresentati soprattutto da *Enterococcus cecorum* e, in minor misura, da altre specie batteriche. Nella patogenesi della BCO restano da chiarire i meccanismi attraverso i quali alcuni ceppi di *Enterococcus cecorum* o di altre specie di *Enterococcus* spp. riescano a prendere il sopravvento sulle altre componenti della microflora intestinale e a raggiungere il circolo ematico, andando in seguito a colonizzare il tessuto osseo. Resta inoltre da chiarire la provenienza di questi ceppi ossia se siano trasmessi verticalmente dai riproduttori oppure se rappresentino dei contaminanti ambientali a livello di incubatoio o di allevamento. Nel corso degli ultimi mesi non sono mancati casi di questa malattia, anche se la gravità delle forme cliniche osservate appare in diminuzione rispetto al passato. Per contro si assiste ad una comparsa sempre più precoce della malattia, osservata talvolta partire dalle due settimane di vita.
- 3) **"False layer syndrome"**: nei primi mesi del 2018 sono ricomparsi alcuni casi di questa patologia che provoca ingenti danni negli allevamenti colpiti. Com'è noto questa sindrome viene osservata in gruppi di galline ovaiole che non riescono a raggiungere il "picco" della deposizione (che, solitamente, si arresta attorno all'80-82%). I soggetti colpiti presentano lesioni caratteristiche all'apparato riproduttore caratterizzate da forme cistiche di varia grandezza a carico dell'ovidutto. Sulla base delle attuali conoscenze si ritiene che la sindrome sia legata ad un'infezione precoce in fase di pollastra sostenuta da ceppi del virus della bronchite infettiva aviaria appartenenti o riconducibili al sierotipo QX. In fase di pollastra l'infezione decorre in forma asintomatica ed è pertanto praticamente impossibile prevedere la comparsa del problema durante la successiva fase produttiva.
- 4) **Altre patologie**: nel corso dei primi mesi dell'anno sono stati osservati alcuni inusuali casi di malattia di Marek in gruppi di polli da carne che, verso la fine del ciclo produttivo, presentavano segni neurologici talvolta localizzati alla regione del collo. La patologia è sfociata in seguito con la comparsa delle tipiche lesioni cutanee al macello.

Di rilievo la comparsa, sia pure sporadica, di alcuni casi di histomoniasi in gruppi di tacchini da carne. Spesso la patologia colpisce solo uno o pochi gruppi dell'allevamento. Nei casi osservati i segni clinici compaiono attorno alla decima settimana di età e la mortalità progredisce inesorabilmente al ritmo del 2-3 % al giorno determinando pesanti perdite (fino al 30% in alcuni dei casi osservati). E' da notare che spesso l'infezione non è associata al riscontro del principale ospite intermedio del protozoo (*Heterakis gallinarum*) facendo quindi ipotizzare, come già descritto, una possibile trasmissione diretta di *Histomonas meleagridis*.

Infine, è stato osservato un insolito caso in pollastre leggere di 70 giorni di età che presentavano una lesione edematoso-congestizia a carico dei bargigli dalla quale è stato isolato un ceppo di *Erysipelothrix rhusiopathiae*. La patologia ha avuto un andamento benigno di tipo "autolimitante". L'assenza di correlazioni epidemiologiche con allevamenti suini lascia aperta l'ipotesi di una trasmissione a partire da volatili selvatici.



## **RIFLESSIONI IN SEGUITO AL RISCONTRO DI RESIDUI DI CLORAMFENICULO IN UN ALLEVAMENTO DI SELVAGGINA**

Scolari A.

*Laboratorio Vallerana Srl, v/Vallerana 7, 26100 Cremona*

### **Riassunto**

Il riscontro di residui di Cloramfenicolo in un allevamento di selvaggina in campioni di mangime misto a granaglie prelevato nelle mangiatoie dalle Autorità Sanitarie è stato lo stimolo per effettuare una ricerca sulle cause che possono far insorgere questa problematica.

Da alcuni anni in diversi paesi europei è stata segnalata la presenza di Cloramfenicolo in prodotti di origine vegetale ed in prodotti di origine animale. Il Cloramfenicolo ed altre sostanze ad azione antimicrobica utilizzate nella terapia medica, sono state selezionate da molecole prodotte naturalmente da batteri che vivono nell'ambiente, in particolare nel sottosuolo. Tra questi, *Streptomyces venezuelae* è un batterio in grado di produrre significative quantità di Cloramfenicolo.

Le ricerche effettuate tra gli anni 2012 e 2013, da Istituzioni Europee che si occupano del controllo ufficiale degli alimenti, hanno dimostrato che il Cloramfenicolo era presente in percentuali rilevanti di campioni di paglia, in altre essenze vegetali e nel suolo in diversi paesi europei. Nel 2014 l'EFSA, su incarico della DG-SANCO, ha effettuato una valutazione del rischio, per persone ed animali, derivante dall'assunzione di Cloramfenicolo proveniente da diverse fonti, tra le quali i vegetali. Nel 2015, presso l'Università di Wageningen (NL) è stata dimostrata la capacità di assorbimento del Cloramfenicolo presente nel sottosuolo, prodotto da *Streptomyces venezuelae*, da parte di frumento e mais.

È importante approfondire anche in Italia queste ricerche, per verificare la presenza in sostanze vegetali di Cloramfenicolo, di altri antibiotici o di metaboliti batterici biologicamente attivi nel sottosuolo, con lo scopo valutare il rischio derivante dalla loro assunzione ed in alcuni casi di chiarire inspiegabili episodi di presenza di residui in derrate di origine vegetale ed animale.

### **Summary**

A research was made after finding an unexpected level of Chloramphenicol in a sample of feed mixed with grain, made by Sanitary Authorities in feeders of a game bird farm, to evaluate which could have been the reasons of this result.

The presence of Chloramphenicol has been reported in the last years in foods of animal and vegetable origin, in several European countries. Chloramphenicol and many other antimicrobials, have been selected from a variety of biologically active metabolites of bacterias living in the subsoil. In particular *Streptomyces venezuelae* is able to produce significant quantities of Chloramphenicol.

Between 2012 and 2013, research has been made by european independent institutions, responsible for quality control of food, and Chloramphenicol has been found to occur in feed, such as straw, in a number of European Member States, and also in herbs, grass and soil samples

In 2014, The European Commission asked EFSA for a scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of Chloramphenicol in food, feed as well as in plants. In 2015, in the University of Wageningen (NL), the ability of wheat and maize to absorb Chloramphenicol produced in the subsoil by *Streptomyces venezuelae* has been demonstrated.

It is important to carry on further research also in Italy, to verify the presence in plants of Chloramphenicol, other antibiotics or biologically active metabolites of bacterias living in the subsoil, in order to evaluate the risk, for humans and animals, deriving from their assumption and sometimes to explain the reason of unexpected residues in food of animal and plant origin.

## DESCRIZIONE DEGLI EVENTI

In data 26/09/2016 le Autorità Sanitarie hanno effettuato prelievi in un allevamento di selvaggina nell'ambito dei controlli istituzionali sulla produzione di carni avicole,

In seguito al riscontro di presenza di Cloramfenicolo, in mangime e granaglie presenti nella mangiatoia di un gruppo di fagiani ed in mangime dalla mangiatoia di un gruppo di pernici, sono stati eseguiti altri prelievi in allevamento in data 7/10/2016, per la ricerca dello stesso farmaco e di altre molecole (una nuova campionatura di mangime direttamente dai silos e campioni di carni ottenute mediante l'abbattimento di diversi capi di fagiani e pernici). L'esito degli esami eseguiti su tutti questi campioni è stato favorevole. Successivamente, in data 20/12/2016, le Autorità Sanitarie, hanno effettuato un ulteriore controllo sull'acqua di abbeverata e sulle granaglie prodotte dall'azienda senza riscontrare alcuna irregolarità. Durante tutto il periodo di raccolta dei campioni i soggetti allevati erano rimasti in buona salute. L'allevatore è stato accusato di attentato alla salute pubblica (*Art. 440 Codice Penale - Chiunque corrompe o adultera acque o sostanze destinate all'alimentazione, prima che siano attinte o distribuite per il consumo, rendendole pericolose alla salute pubblica, è punito con la reclusione da tre a dieci anni*).

Le analisi effettuate ed il loro esito sono riportati nella Tabella 1 sottostante.

**Tabella 1:** Ricerche di sostanze ad azione antimicrobica effettuate dall'Autorità Sanitaria presso l'allevamento di selvaggina tra il 26/09/2016 ed il 20/12/2016 (prima parte).

DATA	MATERIALE PRELEVATO	PUNTO DI PRELIEVO	RICERCA	ESITO	TECNICA
26/09/2016	MANGIME COMPLETO PER SELVAGGINA 3° PERIODO + GRANAGLIE	MANGIATOIA	CLORAMFENICOLO	NON NEGATIVO	ELISA SCREENING MP 02 107 REV. 2 2010
26/09/2016	MANGIME COMPLETO PER SELVAGGINA 3° PERIODO (campione in contraddittorio)	SILOS	CLORAMFENICOLO	NON RILEVATO	ELISA SCREENING MP 02 107 REV. 2 2010

18/10/2016	MANGIME COMPLETO PER SELVAGGINA 3° PERIODO + GRANAGLIE (campione in contraddittorio)	MANGIATOIA	CLORAMFENICOLO	PRESENTE 4,51 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 191 REV. 1 2012
26/09/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	MANGIATOIA	CLORAMFENICOLO	NON NEGATIVO	ELISA SCREENING MP 02 107 REV. 2 2010
18/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO (campione in contraddittorio)	MANGIATOIA	CLORAMFENICOLO	PRESENTE 1,63 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 191 REV. 1 2012

**Tabella 1:** Ricerche di sostanze ad azione antimicrobica effettuate dall’Autorità Sanitaria presso l’allevamento di selvaggina tra il 26/09/2016 ed il 20/12/2016 (seconda parte).

DATA	MATERIALE PRELEVATO	PUNTO DI PRELIEVO	RICERCA	ESITO	TECNICA
07/10/2016	MANGIME COMPLETO PER SELVAGGINA 3° PERIODO	SILOS	CLORAMFENICOLO	NON RILEVATO < 0,15 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 191 REV. 1 2012
07/10/2016	MANGIME COMPLETO PER SELVAGGINA 3° PERIODO	SILOS	COLISTINA	NON RILEVATA < 50 mg/Kg	LC/MS-MS MP 02 347 REV. 0 2012
07/10/2016	MUSCOLO DI PERNICE	CAPANNONE 1	CHINOLONICI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 199 REV. 1 2012
07/10/2016	MUSCOLO DI PERNICE	CAPANNONE 1	TETRACICLINE	NON RILEVATE < 20 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 371 REV. 1 2014
07/10/2016	MUSCOLO DI PERNICE	CAPANNONE 1	SULFAMIDICI	NON NEGATIVO	ELISA SCREENING MP 02 333 REV. 3 2016
07/10/2016	MUSCOLO DI PERNICE	CAPANNONE 1	MACROLIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 175 REV. 3 2015
07/10/2016	MUSCOLO DI PERNICE	CAPANNONE 1	AMMINOGLICOSIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 412 REV. 0 2016
07/10/2016	MUSCOLO DI PERNICE	CAPANNONE 1	CLORAMFENICOLO	NON RILEVATO < 0,15 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 191 REV. 1 2012
07/10/2016	MUSCOLO DI PERNICE	CAPANNONE 1	SULFAMIDICI	NON RILEVATI < 0,25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	CHINOLONICI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 199 REV. 1 2012

07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	TETRACICLINE	NON RILEVATE < 20 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 371 REV. 1 2014
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFAMIDICI	NON NEGATIVO	ELISA SCREENING MP 02 333 REV. 3 2016
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	MACROLIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 175 REV. 3 2015
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	AMMINOGLICOSIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 412 REV. 0 2016
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFATIAZOLO	NON RILEVATO < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFADIAZINA	NON RILEVATA < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFADIMETOSSINA	NON RILEVATA < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFAMONOMETOSSINA	NON RILEVATA < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFAMETOSSAZOLO	NON RILEVATO < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFAMERAZINA	NON RILEVATA < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	SULFAMETAZINA	NON RILEVATA < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 220 REV. 1 2013
07/10/2016	MUSCOLO DI FAGIANO	VOLIERA 3	CLORAMFENICOLO	NON RILEVATO < 0,15 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 191 REV. 1 2012
07/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	SILOS ADIACENTE BOX N.1 (VOL.8-9-10-11)	TETRACICLINE	NON RILEVATE	MICROBIOLOGICA MP 02/003 REV 9 2015
07/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	SILOS ADIACENTE BOX N.1 (VOL.8-9-10-11)	CHINOLONICI	NON RILEVATI	MICROBIOLOGICA MP 02/003 REV 9 2015
07/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	SILOS ADIACENTE BOX N.1 (VOL.8-9-10-11)	PENICILLINE PENICILLINASI SENSIBILI	NON RILEVATE	MICROBIOLOGICA MP 02/003 REV 9 2015

07/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	SILOS ADIACENTE BOX N.1 (VOL.8-9-10-11)	SULFAMIDICI	NON RILEVATI < 0,1 Mg/Kg per ciascun analita	TLC MP 02 056 REV 3 2014
07/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	SILOS ADIACENTE BOX N.1 (VOL.8-9-10-11)	CLORAMFENICOLO	NON RILEVATO < 0,15 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 191 REV. 1 2012
07/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	SILOS ADIACENTE BOX N.1 (VOL.8-9-10-11)	COLISTINA	NON RILEVATA < 50 mg/Kg	LC/MS-MS MP 02 347 REV. 0 2012
<b>DATA</b>	<b>MATERIALE PRELEVATO</b>	<b>PUNTO DI PRELIEVO</b>	<b>RICERCA</b>	<b>ESITO</b>	<b>TECNICA</b>
07/10/2016	MANGIME COMPLEMENTARE PER SELVAGGINA 2° PERIODO	SILOS ADIACENTE BOX N.1 (VOL.8-9-10-11)	MACROLIDI	NON RILEVATI	MICROBIOLOGICA MP 02/003 REV 9 2015
20/12/2016	GRANO CON FAVINO	PRODUZIONE PROPRIA	SOSTANZE INIBENTI	NON RILEVATE	MICROBIOLOGICA MP 02/003 REV 9 2015
20/12/2016	MAIS IN GRANELLA	CONSEGNA 09/12/2016	SOSTANZE INIBENTI	NON RILEVATE	MICROBIOLOGICA MP 02/003 REV 9 2015
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	CHINOLONICI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 199 REV. 1 2012
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	TETRACICLINE	NON RILEVATE < 25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 371 REV. 1 2014
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	SULFAMIDICI	NON RILEVATI < 0,25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 333 REV. 3 2016
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	SOSTANZE INIBENTI	NON RILEVATE	MICROBIOLOGICA MP 02/240 REV 0 2010
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	MACROLIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 175 REV. 3 2015
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	LINCOMICINA	NON RILEVATA < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 223 REV. 1 2013
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	AMMINOGLICOSIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 412 REV. 0 2016
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	CLORAMFENICOLO	NON RILEVATO < 0,15 µg/Kg	ELISA SCREENING MP 02 107 REV. 2 2010
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	CHINOLONICI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 199 REV. 1 2012

20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	TETRACICLINE	NON RILEVATE < 25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 371 REV. 1 2014
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	SULFAMIDICI	NON RILEVATI < 0,25 µg/Kg per ciascun analita	ELISA SCREENING MP 02 333 REV. 3 2016
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	SOSTANZE INIBENTI	NON RILEVATE	MICROBIOLOGICA MP 02/240 REV 0 2010
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	MACROLIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 175 REV. 3 2015
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	LINCOMICINA	NON RILEVATA < 25 µg/Kg	LC/MS-MS MP 02 223 REV. 1 2013
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	AMMINOGLICOSIDI	NON RILEVATI < 25 µg/Kg per ciascun analita	LC/MS-MS MP 02 412 REV. 0 2016
20/12/2016	ACQUA DI ABBEVERATA	FAGIANI	CLORAMFENICOLO	NON RILEVATO < 0,15 µg/Kg	ELISA SCREENING MP 02 107 REV. 2 2010

## IL CLORAMFENICOLO

Il Cloramfenicolo è un antibiotico ad ampio spettro di azione che è stato utilizzato in passato negli animali produttori di alimenti. La molecola è stata valutata dal punto di vista tossicologico negli anni da diverse Organizzazioni Internazionali (USFDA–1985; IARC–1990; EMEA–1996)(1,2,3).

Più recentemente, nel 62° Meeting della Commissione Congiunta di Esperti FAO/WHO sugli Additivi Alimentari (JEFCA)(4), il Cloramfenicolo è stato classificato come sostanza avente cancerogenicità sospetta e, per la sua correlazione con episodi di anemia aplastica, ne è stato vietato l'utilizzo in zootecnia nell'Unione Europea (Regolamento UE 37/2010) ed in altri paesi, tra i quali gli Stati Uniti, il Canada, l'Australia, il Giappone e la Cina.

In base alla Decisione della Commissione UE 181/2003, è stato stabilito un Limite Minimo di Rilevabilità del Cloramfenicolo di 0.3 µg/kg, che corrisponde anche al Valore di Riferimento per intraprendere azioni in caso di riscontri positivi.

## LA PRESENZA DI CLORAMFENICOLO NEL SOTTOSUOLO, NEI VEGETALI E NEI PRODOTTI DI ORIGINE VEGETALE

La maggioranza delle sostanze ad azione antimicrobica utilizzate nella terapia medica è stata ottenuta selezionando le molecole prodotte naturalmente da batteri che vivono nell'ambiente.

Gli antibiotici sono ampiamente presenti in natura ed hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'equilibrio tra le popolazioni microbiche, tanto nel terreno quanto negli ambienti acquatici. Diverse centinaia di antibiotici (tra quelli prodotti in natura) sono stati selezionati e purificati e solo pochi tra questi hanno una tossicità

bassa che ne consenta l'utilizzo nella terapia medica. (5)

Il genere *Streptomyces* produce il 55% delle circa 5.000 molecole ad azione antibiotica identificate tra il 1945 ed il 1978 ed in genere, gli antibiotici più utilizzati in terapia sono prodotti da batteri appartenenti ai generi *Penicillium*, *Streptomyces*, *Cephalosporium*, *Micomonospora* e *Bacillus*. (5).

In particolare, *Streptomyces venezuelae* è un batterio in grado di produrre significative quantità di Cloramfenicolo (6), anche altri batteri sono in grado di farlo: *Streptomyces phaochromogenes* var. *chloromyceticus* (7)(8); *Streptomyces omiyaensis* (8); *Streptomyces viridogriseum* var. *Kofuense* (S2-28) (7); *Kitasatoa spp.* (7); *Corynebacterium hydrocarboclastus* (9).

A partire dal 2010 è stata riscontrata la presenza di Cloramfenicolo in prodotti di origine vegetale ed in prodotti di origine animale, in diversi paesi europei ed extraeuropei (ved. Tabella 2).

**Tabella 2:** Recenti riscontri di Cloramfenicolo in vegetali e prodotti di origine vegetale (Fonte EFSA)

ESSENZA/PRODOTTO	CONCENTRAZIONE RISCONTRATA µg/kg	FONTE
Paglia (frumento ed orzo)	1,9	GMP+ 2015 (*)
Paglia (frumento)	28	GMP+ 2014 (*)
Paglia (tipologia sconosciuta)	0,3 – 8,7	NVWA 2012 (**)
Paglia (frumento)	5,8 – 6,2	NVWA 2012 (**)
Paglia (colza)	1,1 – 3,6	NVWA 2012 (**)
Paglia (tipologia sconosciuta)	0,1 - 11	Stolker et al - 2012
Paglia (tipologia sconosciuta)	0,3 – 6,8	Berendsen et al - 2013
Paglia (tipologia sconosciuta)	2 - 32	Nordkvist - 2013
Orzo	0,11	NVWA 2012 (**)
Bucce di farro	0,94	NVWA 2012 (**)
Insilato di mais	0,10 - 0,46	NVWA 2012 (**)
Insilato d'erba	0,36	NVWA 2012 (**)
Fieno	0,37	NVWA 2012 (**)
Erba ( <i>Artemisia frigida</i> )	1,3 ; 175	Berendsen et al - 2010
Erba ( <i>Artemisia frigida</i> ) radici	0,3 ; 3 ; 3,8	Berendsen et al - 2010
Erba ( <i>Artemisia frigida</i> ) foglie	0,3	Berendsen et al - 2010
Erba ( <i>Artemisia sieversiana</i> )	4 ; 5 ; 8 ; 20 ; 46 ; 160	Berendsen et al - 2010
Erba ( <i>Artemisia sieversiana</i> ) radici	2,8	Berendsen et al - 2010
Erba ( <i>Artemisia sieversiana</i> ) foglie	2	Berendsen et al - 2010
Erba ( <i>Thermopsis daurica</i> )	21 ; 25	Berendsen et al - 2010
Erba ( <i>Thalicttrum simplex</i> )	50 ; 40 , 450 ; 14 ; 43 ; 0,3	Berendsen et al - 2010
Erba (Mongolia) foglie	0,6 ; 1,2	Berendsen et al - 2010
Erba (Mongolia) radici	0,3 ; 0,3 ; 0,6	Berendsen et al - 2010
Sottosuolo	0,2	Berendsen et al - 2010

(\*) GMP+ : Ente di certificazione olandese

(\*\*) NVWA : Autorità per la Sicurezza degli Alimenti e dei Consumatori in Olanda

In molti casi il riscontro non era collegato all'utilizzo illegale del farmaco e non era possibile stabilire la causa della sua presenza. **Le Autorità Sanitarie di alcuni paesi europei hanno deciso di affrontare il problema con atteggiamento pragmatico e non esclusivamente repressivo.** Per questo motivo hanno promosso ricerche complesse e costose che sono di seguito descritte:

1) In Svezia, in un piano di monitoraggio pubblicato nel 2016 ed effettuato nell'anno 2013(10), sono stati prelevati 215 campioni di paglia in aziende agricole dislocate nel Sud-Est del territorio svedese. La paglia era stata prodotta con diverse tipologie di cereali (frumento, orzo, avena, triticale ed altri) ed era utilizzata come lettiera in ricoveri per bovini. I campioni sono stati tutti prelevati da Veterinari Ufficiali ed inviati al Laboratorio Nazionale di riferimento, il National Veterinary Institute (SVA) di Uppsala. È stata riscontrata la presenza di Cloramfenicolo in concentrazione superiore a 0,1 µg/kg nel 25,8% dei campioni, analizzati sia con tecnica ELISA che con gascromatografia (GC-LC-LC). La concentrazione massima riscontrata è stata di 31,7 µg/kg di Cloramfenicolo in paglia di orzo. La distribuzione geografica dei siti di campionamento con indicazione delle concentrazioni di Cloramfenicolo rinvenute, è riportata nella Figura 1. I campioni con valori più elevati sono stati riscontrati in aziende situate in prossimità della costa (con clima più mite).

**Figura 1:** Aree della Svezia sottoposte a campionamento per la ricerca di Cloramfenicolo nella paglia. I campioni positivi sono identificati con cerchi grigi (> a 0,1 µg/kg) o neri (> a 10 µg/kg).



2) In altri paesi europei (Olanda, Germania, Francia, Regno Unito e Danimarca), sono stati prelevati nel corso del 2012, 105 campioni di paglia, prodotta con diverse specie di cereali. I campioni sono stati analizzati dall'Istituto RIKILT presso l'Università di Wageningen e sono state riscontrate su di essi le concentrazioni di Cloramfenicolo riportate in Tabella 3. (11). È importante segnalare l'elevata percentuale di campioni positivi (colonna 4)

**Tabella 3:** Riscontri di Cloramfenicolo in campioni di paglia provenienti da diversi paesi europei

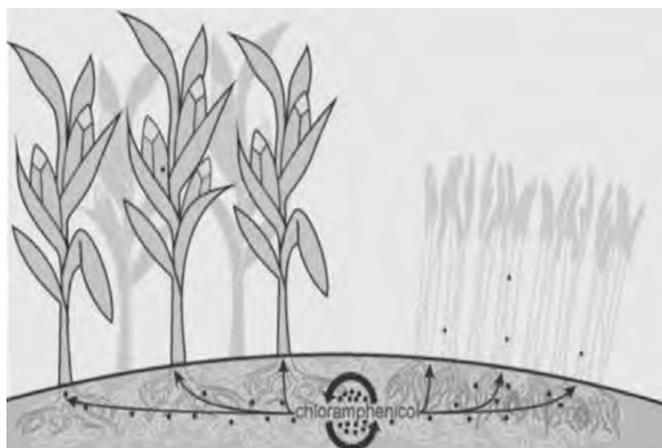
Nazione	N. Campioni	N. Campioni > 0,1 µg/kg	% campioni pos.	Concentr. Massima µg/kg
Olanda	75	25	33,3	6,3
Germania	13	4	30,7	4
Francia	14	4	28,5	0,2
Regno Unito	2	2	100	0,2
Danimarca	1	1	100	1

3) Nel 2015 l'Istituto Governativo che si occupa della sicurezza degli alimenti in Olanda, presso l'Università di Wageningen (RIKILT), ha effettuato diversi studi (finanziati anche con fondi del Ministero degli Affari Economici olandese), con i seguenti scopi (12):

- confermare la presenza di Cloramfenicolo nel sottosuolo
- verificare la stabilità della molecola in diversi ambienti del sottosuolo
- valutare la capacità del germe *Streptomyces venezuelae* di produrre Cloramfenicolo
- determinare se il Cloramfenicolo prodotto nel sottosuolo ha la possibilità di essere assorbito dalle radici delle piante e di concentrarsi in quantità rilevabili nelle strutture dei vegetali.

L'insieme delle ricerche effettuate sono visualizzate graficamente nella Figura 2

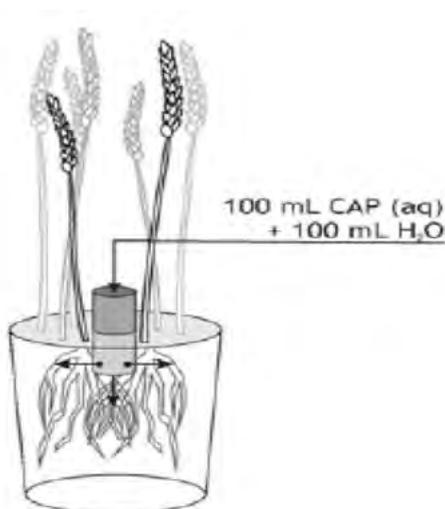
**Figura 2:** Assorbimento del Cloramfenicolo dal suolo da parte dei cereali



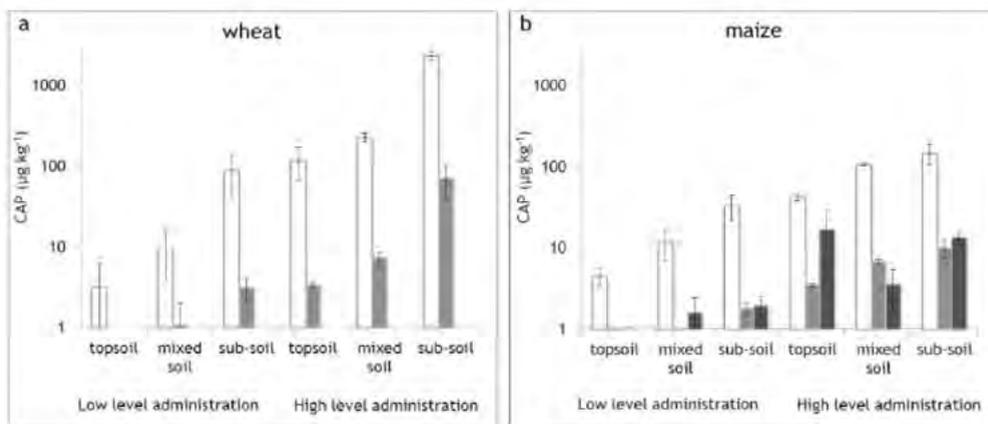
I risultati ottenuti dai ricercatori olandesi sono di seguito riassunti:

- Il cloramfenicolo è presente nei terreni, ma nello strato superficiale del terreno viene rapidamente degradato.
- La sua stabilità è fortemente influenzata dalla presenza di microrganismi nel terreno analizzato (in terreni sterili rimane stabile per diversi giorni, in presenza di batteri viene degradato).
- Il germe *Streptomyces venezuelae* è in grado di produrre quantità significative di Cloramfenicolo su terreno sterile incubato a 28°C (fino a 500 µg/kg dopo la prima settimana di incubazione). Su terreni non sterili, la quantità di Cloramfenicolo prodotta è minore, probabilmente per la competizione con altri batteri (fino a 140 µg/kg), ma la produzione è rimasta stabile per tutti i 22 giorni dell'esperimento.
- La capacità dei vegetali di assorbire Cloramfenicolo dal terreno è stata dimostrata ed i risultati ottenuti sono riassunti nella Figura 4, nella quale sono rappresentate le concentrazioni della molecola, ottenute in diverse frazioni di due specie vegetali (gambo, spighe e pannocchie di frumento e mais), cresciute su tre tipi di terreno (suolo superficiale, profondo e misto) e con due concentrazioni di Cloramfenicolo (7,5 mg/vaso e 75 mg/vaso) (Figura 3).

**Figura 3:** rappresentazione schematica dei vasi utilizzati nell'esperimento



**Figura 4:** Concentrazioni di Cloramfenicolo ottenute nei diversi esperimenti



Didascalia: **wheat:** frumento / **maize:** granturco

**low/high level :** aggiunta bassa/alta di Cloramfenicolo

**top/mixed/subsoil:** suolo superficiale, profondo e misto

**barra bianca** (gambo); **barra grigio chiara** (spiga/pannocchia); **barra scura** (terreno)

**I risultati ottenuti sono così riassunti: il Cloramfenicolo si trasferisce dalle radici allo stelo ed ai semi, si concentra soprattutto nel frumento, soprattutto nei gambi rispetto ai semi, soprattutto utilizzando terreno proveniente dal sottosuolo.**

Anche la Commissione Europea, sulla base dei riscontri di Cloramfenicolo in alimenti di origine animale ed in sostanze vegetali, nel 2014 ha chiesto all’Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) di valutare i rischi per la salute umana ed animale derivanti dall’assunzione di questa molecola (13).

Nelle conclusioni della corposa relazione prodotta, l’EFSA elenca al primo posto tra le cause di assunzione di Cloramfenicolo da parte di persone o animali, la produzione naturale dell’antibiotico da parte dei batteri del sottosuolo, che può essere assorbito dai vegetali.

... (omissis)... “Chloramphenicol can be produced by bacteria in the soil, where it is rapidly degraded by other soil organisms. However, it can partly be absorbed by plants, thus explaining recent findings in herbs, grass and straw.” ... (omissis)...

... (omissis)... “Il Cloramfenicolo può essere prodotto da batteri nel terreno, dove è rapidamente degradato da altri batteri presenti. Tuttavia, può essere parzialmente assorbito da essenze vegetali, così si spiegano i recenti riscontri nei vegetali, erba e paglia” ... (omissis)...

L’EFSA, nella base di dati del Sistema di Allerta Rapida Europeo per Alimenti e Mangimi (RASFF), dal 2002 al 2013, ha identificato anche 24 notifiche di presenza

di Cloramfenicolo in integratori enzimatici, concentrati di enzimi ed in alimenti/mangimi che li contenevano, ed ha inserito queste sostanze tra i fattori di rischio. L'EFSA ha valutato anche il rischio per uomini ed animali che potenzialmente potrebbe derivare dall'assunzione di residui di Cloramfenicolo dai vegetali, da alimenti di origine animale e da integratori enzimatici. La conclusione è stata che i livelli riscontrati nelle tre fonti di contaminazione non sono sufficienti per provocare anemia aplastica (uno degli effetti collaterali dell'assunzione di Cloramfenicolo), mentre per quanto riguarda il rischio di cancerogenicità non è stato possibile emettere un parere, poiché è stato ipotizzato per la molecola solo il "sospetto" che possieda tale attività e quindi i dati epidemiologici a disposizione sono insufficienti.

Allo stato attuale delle conoscenze è comunque difficile valutare con esattezza quante e quali siano le molecole ad azione antibiotica o le sostanze biologicamente attive che possono essere assunte dal consumatore con gli alimenti di origine vegetale, anche se possiamo ricavare alcune indicazioni da reperti archeologici: ricerche svolte sui resti di abitanti dell'antica Nubia, vissuti tra il III ed il V secolo D.C., hanno dimostrato che nelle ossa rinvenute in cimiteri nella località di Kulubnarti (un'isola sul fiume Nilo), erano presenti tetracicline in concentrazioni simili a quelle che si possono raggiungere con trattamenti terapeutici (assunzioni giornaliere di 1-2 g di tetracicline/persona). La deposizione delle tetracicline, in relazione alla crescita dell'osso, dimostrava che l'assunzione dell'antibiotico era avvenuta in alcuni casi nel corso di tutta la vita dei soggetti esaminati (14).

La presenza di tetracicline nelle ossa degli antichi abitanti della Nubia è stata attribuita alla dieta ricca in alimenti vegetali di quel popolo (il grano, l'orzo e il miglio erano i prodotti base della dieta nubiana, assunti sotto forma di birra e pane).

## **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

In relazione al riscontro di residui di Cloramfenicolo nell'allevamento di selvaggina possono essere fatte le seguenti considerazioni:

- in allevamento non è stato possibile provare in maniera definitiva che i residui di Cloramfenicolo riscontrati fossero di origine naturale, i prelievi erano stato fatti nel 2016 e la conclusione dell'iter giuridico è avvenuta nel 2018. Le materie prime ed i soggetti allevati non erano più presenti nella struttura.
- Tuttavia, sulla base delle argomentazioni riportate dalla difesa, il Pubblico Ministero ha ritirato le accuse e gli allevatori sono stati assolti con formula piena.
- la sensibilità e la specificità raggiunte dai metodi di analisi (per la ricerca di Cloramfenicolo è stata utilizzata in questo caso la Cromatografia Liquida Multidimensionale abbinata alla Gascromatografia), devono indurre le Autorità Sanitarie ad valutare con attenzione gli esiti dei test, sia attraverso approfondimenti che con la raccolta di informazioni (in questo caso i soggetti erano sani, non era stati effettuati altri trattamenti con antibiotici in allevamento, ecc), per evitare di adottare severi provvedimenti punitivi per eventi che potrebbero scaturire da fenomeni naturali. Già nel 1946 era stata scientificamente dimostrata la "Produzione di sostanze antibiotiche da parte degli attinomiceti" (15).

Dall'episodio analizzato possono essere tratte anche alcune deduzioni di carattere generale:

- gli attinomiceti presenti nel sottosuolo producono una vasta gamma di metaboliti attivi biologicamente tra i quali molti antibiotici.
- solo una piccola percentuale tra queste sostanze ha superato le prove tossicologiche ed ha potuto essere utilizzata in terapia. Il rischio, per l'uomo e gli animali, si una loro assunzione, legata all'assorbimento dal sottosuolo da parte di essenze vegetali non è valutato. La problematica merita di essere approfondita attraverso ulteriori ricerche.
- Gli antibiotici possono essere frequentemente presenti negli alimenti di origine vegetale, a volte in concentrazioni significative, in relazione alla loro diffusione in natura. Al contrario, negli alimenti di origine animale questo rischio è estremamente ridotto per l'azione depurante che l'organismo animale effettua sugli alimenti introdotti: è il contrario di quanto percepisce il consumatore su questo argomento.

## RIFERIMENTI

- 1) US Food and Drug Administration (USFDA). 1985. Chloramphenicol oral solution; opportunity for hearing. 50 Fed. Reg. 27059. Washington (DC): U.S. Government Printing Office.
- 2) International Agency for Research on Cancer. 1990. Summaries & evaluations - chloramphenicol. Lyon (France): IARC; Vol. 50.
- 3) European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). 1996. European committee for veterinary medicinal products. Chloramphenicol summary report. (2013 Jan 21). [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500012060.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500012060.pdf)
- 4) Wongtavatchai J, McLean L, Ramos F, Arnold D 2004. World health organization: joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), chloramphenicol. International Programme on Chemical Safety - INCHEM WHO Food Additives series: 53. WHO Food Additives series. 53: 7-85.
- 5) Antibiotic Production by Microbes Isolated From Soil . Sonia Sethi, Ravi Kumar and Saksham Gupta Dr. B. Lal; Institute of Biotechnology, Malviya Nagar, Jaipur-302017, Rajasthan, India; International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research , 2013; Vol. 4(8): 2967-2973.
- 6) Antibiotic-producing fungi present in the soil environment of Keffi metropolis, Nasarawa state, Nigeria, Trakia. Makut and Owolewa. Journal of Sciences, Volume 9(2), 2011, pag. 33-39.
- 7) Regulation of chorismate-derived antibiotic production. Malik. Advances in Applied Microbiology, Volume 25, 1979, pag. 75-91.
- 8) A cryptic plasmid in the chloramphenicol-producing actinomycete, *Streptomyces phaeochromogenes*, Doull et al., FEMS Microbiology Letters, Volume 16(2-3), 1983, pag. 349-352.
- 9) Distribution of chloramphenicol acetyltransferase and chloramphenicol-3-acetate esterase among *Streptomyces* and *Corynebacterium*. Nakano et al., Journal of Antibiotics, Volume 30 (1), 1977, pag. 76-82.
- 10) Occurrence of chloramphenicol in cereal straw in north-western Europe. Erik

Nordkvista, Tina Zuidemab, Rik G. Herbesc and Bjorn J.A. Berendsen - Food Additives & Contaminants: Part A, 2016

VOL. 33, N. 5, 798–803.

11) Occurrence of Chloramphenicol in Crops through Natural Production by Bacteria in Soil. Bjorn Berendsen, Mariel Pikkemaat, Paul Römken, Robin Wegh, Maarten van Sisseren, Linda Stolker, and Michel Nielen. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61 (17), pp 4004–4010.

12) The natural occurrence of chloramphenicol in crops. Berendsen, B., T. Zuidema and J. de Jong 2015.. Wageningen, RIKILT Wageningen UR (University & Research centre), RIKILT report 2015.009.

13) Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed - EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) - European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy - *EFSA Journal* 2014;12(11):3907.

14) Armelagos, G. J., K. Kolbacher, et al. (2001). Tetracycline consumption in prehistory. *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*. M. Nelson, W. Hillen and R. A. Greenwald, Birkhäuser Verlag.

15) Selman A. Waksman Albert Schatz Donald M. Reynolds. Production of antibiotic substances by actinomycetes

*Annals of the New York Academy of Sciences* - First published: September 1946.





ATTI DEL LVII CONVEGNO ANNUALE

## CONVEGNO

**“Allevamento avicolo senza uso  
degli antibiotici: realtà e prospettive”**

Marmiolo (MN), 10-11 Maggio 2018



# PROCEDURES TO REAR ANTIBIOTIC-FREE CHICKENS IN POULTRY MEAT PRODUCTION

Pearson D.

*Aviagen Veterinary health director, GB-EUROPE*

**Aviagen**

Procedures to Rear Antibiotic-free Chickens in Poultry Meat Production

**Daniel B Pearson**  
Veterinary Health Director - Europe

## Outline

- Introduction – key drivers
- Background in Europe
- Different definitions of Antibiotic Free in USA
- Basic Principles of ABF / Antibiotic Reduction
- Disease Challenges to overcome
- Management of Antibiotic Free
  - hatchery
  - Broiler management
- Future

**Aviagen**

## Power of the Media

Antibiotics crisis could lead to 'millions of deaths'

14 May 2016 Last updated at 14:30 BST

Telegraph, 21/11/16

**Two in three chickens sold in British supermarkets are 'infected with E.coli superbug'**

**Antibiotic Apocalypse**

14 May 2016 Last updated at 14:02:07

**Life before antibiotics (and maybe life after an antibiotic apocalypse)**

14 May 2016 Last updated at 14:02:07

**Efsa: resistente tegen antibiotica neemt toe**  
*resistance to antibiotics increases*

The Daily Mail, 5/9/16

**E.coli superbug in 1 in 4 supermarket chickens: Antibiotic-resistant strain is found on shelves at seven leading chains**

• Swarming colonies of E.coli found in 1 in 4 supermarket chicken samples  
• Reservations raise concerns about factory farms and safety of fresh meat  
• E.coli detected on 22 of 92 chicken pieces bought from 7 supermarkets  
• Meat from Tesco, Asda, Sainsbury's, Morrisons, M&S, Co-op, Aldi

14 May 2016 Last updated at 14:02:07

Telegraph, 21/11/16

**Two thirds of fresh chickens in UK supermarkets 'contaminated with E. Coli'**

Experts fear the strain of the superbug found in the meat could cause resistance to antibiotics

**Aviagen**

## Background

Media centre

WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health

New WHO report provides the most comprehensive picture of antibiotic resistance to date, with data from 114 countries

**WHO Report 2014**  
**AMR is now a major threat to public health**

world and has the potential to affect anyone, of any age, in any country. Antibiotic resistance is often being passed from animals to people who need them to treat infections, now a major threat to public health.

"Without urgent, coordinated action by many stakeholders, the world is headed for a post-antibiotic era, in which common infections and minor injuries which have been treatable for decades can once again kill," says Dr Tedros Adhanom, WHO's Assistant Director-General for Health Security. "Effective antibiotics have been one of the pillars allowing us to live longer, healthier, and benefit from modern medicine. Unless we take significant actions to improve efforts to prevent infections and also change how we produce, prescribe and use antibiotics, the world will lose more and more of these global public health goods and the implications will be devastating."

**Aviagen**

## Animal Use

DRIVERS, DYNAMICS AND EPIDEMIOLOGY OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ANIMAL PRODUCTION

Authors  
B.A. Wall, A. Matos, L. Marshall and D.U. Pfeiffer  
Veterinary Epidemiology, Economics and Public Health Group, Department of Production and Population Health, The Royal Veterinary College, North Mymms, London, UK  
Co-authors  
J. Lubitz, H.J. Ormel, P. Otto and A. Patriarchi  
Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy  
**Rome, 2016**

**Aviagen**

## Transmission of AMR to Humans

FIGURE 7. Conceptual framework for the spread of AMR genes in a poultry production system

Source: Davis et al. 2011  
DRIVERS, DYNAMICS AND EPIDEMIOLOGY OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ANIMAL PRODUCTION - FAO, Rome, 2016

**Aviagen**

## O'Neil Report

**ANTIMICROBIALS IN AGRICULTURE AND THE ENVIRONMENT: REDUCING UNNECESSARY USE AND WASTE**

THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE  
COMPILED BY JEFF PHELPS

**PAPERS PROVIDE SUPPORT FOR LIMITING USE OF ANTIBIOTICS IN AGRICULTURE BY COUNTRY**

15 countries provide support for limiting use

7 countries provide support for limiting use

## Why Restrict Antibiotic Use in Poultry

- The ability to transfer resistance to people – one health
- Consumer Pressure
  - MARKETING
- AMR in bacteria infecting our stock
  - Less effective antibiotics
  - Lack of development of new antibiotics

Aviager

EFSA, EMA and EMA second joint report, 2016

**Table 5. Consumption of antimicrobials in humans and food-producing animals, expressed as the population-weighted biomass of the corresponding populations in 1,000 tonnes and consumption expressed in mg/kg biomass<sup>(1)</sup> in 20 EU MSAs, 2014<sup>(2)</sup>**

Country	Inclusion of 2014 consumption of the	Consumption in tonnes of active ingredients			Estimated biomass in 1,000 tonnes			Consumption in mg/kg biomass
		Humans	Animals	Total	Humans	Animals	Total	
Austria	Yes	39	53	92	932	746	1,678	793
Belgium	Yes	857	266	1,123	700	1,438	2,138	1,514
Bulgaria	Yes	13	23	36	403	703	1,106	629
Croatia	Yes	34	31	65	273	339	612	314.8
Cyprus	Yes	7	42	49	34	507	541	301.5
Czech Republic	Yes	65	56	121	657	703	1,360	98.4
Denmark	Yes	80	167	247	302	2,435	2,737	1,425
Estonia	Yes	6	10	16	82	127	209	71.7
Finland	Yes	47	51	98	241	360	601	292.3
France	Yes	757	761	1,518	4,138	11,228	15,366	1,070
Germany	Yes	267	3,206	3,473	5,249	6,746	11,995	3,463
Hungary	Yes	13	150	163	617	776	1,393	86.6
Ireland	Yes	7	12	19	38	136	174	62
Italy	Yes	624	1,432	2,056	3,799	3,977	7,776	1,083
Lithuania	Yes	10	6	16	126	178	304	81.4
Luxembourg	Yes	19	17	36	184	376	560	355
Netherlands	Yes	4	7	11	74	52	126	49.9
Norway	Yes	10	214	224	1,052	3,129	4,181	493
Poland	Yes	363	578	941	3,276	4,108	7,384	1,408
Portugal	Yes	18	190	208	623	942	1,565	216.4
Romania	Yes	206	98	304	3,247	3,540	6,787	381
Slovakia	Yes	47	16	63	336	748	1,084	62.9
Slovenia	Yes	14	6	20	139	175	314	134
Spain	Yes	327	2,964	3,291	2,907	3,077	5,984	1,124
Sweden	Yes	72	9	81	603	811	1,414	1,193
United Kingdom	Yes	568	436	1,004	4,022	4,433	8,455	821
EU <sup>(3)</sup>		3,413	6,827	10,240	33,034	58,934	91,968	1,111

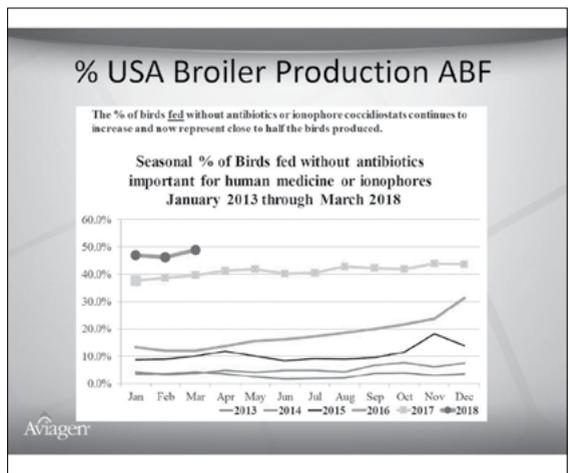
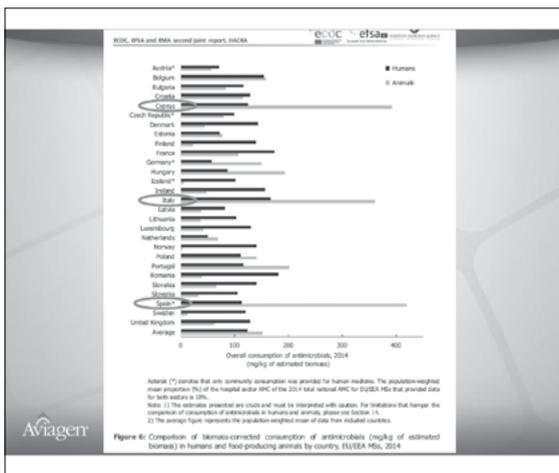
Aviager

### Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015 Seventh ESVAQ report

**Table 6. Sales, in terms of active ingredients, of veterinary antimicrobial agents marketed in 2015 for food-producing animals: population-weighted sales (PWS) and sales in mg/kg, by country for 2015**

Country	Sales (tonnes) for food-producing animals	PWS (1,000 tonnes)	mg/kg PWS
Austria	48.3	937	52.7
Belgium	108.1	1,719	105.1
Bulgaria	46.3	986	133.6
China	27.9	274	261.9
Croatia	46.9	508	434.2
Czech Republic	47.0	688	461.1
Denmark	332.9	2,432	542.2
Estonia	5.1	123	49.2
Finland	24.0	349	294.4
France	801.9	5,747	394.1
Germany	801.1	6,090	371.1
Italy	72.6	1,308	171.1
Hungary	174.0	610	351.4
Ireland	5.0	100	50.0
Lithuania	6.0	4,892	333.0
Luxembourg	1.0	100	100.0
Netherlands	1.0	100	100.0
Norway	1.0	100	100.0
Poland	1.0	100	100.0
Portugal	1.0	100	100.0
Romania	1.0	100	100.0
Slovakia	1.0	100	100.0
Slovenia	1.0	100	100.0
Spain	1.0	100	100.0
Sweden	1.0	100	100.0
United Kingdom	1.0	100	100.0

Aviager





## Consumer Pressure

Restaurant Brands International **Mandate Antibiotic-Free Specifications** Jan 4, 2017

Restaurant Brands International, operators of the Burger King and Tim Hortons chains announced that antibiotics classified as critically important in terms of FDA nomenclature, will be disallowed in raising birds and flocks entering the company supply chain.

This action is regarded more as a promotional exercise for their brand rather than any advance in public health. In accordance with FDA regulations, antibiotics designated as Guidance Documents will be strictly controlled and under direct veterinary prescription or a Veterinary Feed Directive from January 2017 onwards.

Virtually all U.S. restaurant chains and **grocers** have made commitments to restrict antibiotic administration, starting with the initial announcement by Chick-fil-A® and followed by McDonald's Corporation, Wendy's Company and Jack in the Box, among others.

## Critically Important Antimicrobials

### Medically Important Antimicrobials Listed by the World Health Organization

**CRITICALLY IMPORTANT ANTIMICROBIALS**

- Aminoglycosides
- Carbapenems and other beta-lactams
- Glycopeptides\* (Vancomycin)
- Quinolones
- Specific tetracycline antimicrobials and

### Highest Priority Critically Important Antimicrobials (5th Revision - 2016)

- Quinolones (fluoroquinolones = enrofloxacin)
- 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation Cephalosporins (= ex-cenel /maxcel)
- Macrolides and ketolides (= tylosin, tilmosin)
- Glycopeptides (such as vancomycin, avoparcin)
- Polymyxins (= Colistin)

(EFSA – fluoroquinolones and 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation cephalosporins and colistin?)

- Monoclonals
- Almonds

## What is Antibiotic Free (ABF)?

- Antibiotic Free
  - Remember technically all chicken sold is “antibiotic free” meaning that there are no residues of antibiotics in the meat (**no label for this**)
    - Withdrawal dates if antibiotics are used in food animals
    - Also there are no toxin or pesticide residues
  - This is already required by law in the USA

## Different Labels, programs and organizations

- “No Antibiotics Ever” **NAE** program – Labeled
- No Human Class Drugs/Ionophore Only Type Program
  - A step down/\*\*\*/Not Labeled
- CLAU program - Seal
- Organic – Labeled
- Naturally Raised - Labeled

## No Antibiotics chickens or No Antibiotics Administered (No Antibiotics Ever-NAE) Labeled

- Raised without antibiotics are chickens which have never received antibiotics from birth to harvest, including in the egg (*in-ovo*).
  - This includes no AGPs and Ionophores!!!
- The term “no antibiotics added” may be used on labels for meat and poultry products if sufficient documentation is provided by the producer to the Agency demonstrating that the animals were raised without antibiotics
- If flocks are treated, they lose their designation
- There is no inspection process to verify this label before it is employed

Aviagen

## No Human Class Drugs/Ionophore Only Type Program

A step down/\*\*\*Not Labeled

- No antibiotics in hatchery
- No human class drugs deemed important according to WHO allowed
  - So ionophores and chemicals allowed
  - In USA BMD allowed (FDA deems not important)
- No treatments allowed
- Costco/McDonalds/Subway

**COSTCO**  
WHOLESALE

**SUBWAY**  
Eat fresh



Aviagen

## CRAU- New Program

FOOD FOCUS

Who We Are How We Work Procurement Change Tools Certified Responsible Antibiotic Use



## Certified Responsible Antibiotic Use

School Food Focus created this standard to address responsible use of antibiotics in poultry production.



Aviagen

## CRAU- Sept 29, 2016

- To minimize the use of antibiotics in poultry production, and offer schools a viable way to put a better poultry on the menu
- Prescribed by licensed veterinarian and verified by USDA
- No pre-hatch antibiotics
- No antibiotics with analogues in human medicine allowed for disease prevention, growth promotion, feed efficiency or weight gain
  - But can be used to treat disease in poultry diagnosed with bacterial disease or control disease in poultry exposed to infectious bacteria
- If any antibiotics with analogues to human drugs are used for more than two consecutive growing cycles within the same poultry barn/house, a written veterinary statement must be submitted of use and a plan of corrective action.
- \*\*\* No special plant requirements needed

Aviagen

## USDA Organic

- This seal is the most robust
- Federal organic regulations prohibit antibiotic use in livestock and must be verified by an independent, accredited certifier



Aviagen

## USDA Organic

- All veg diet
- No GMO's or toxic synthetic pesticides (pesticides or chemical fertilizers)
- They can be given antibiotics the first day of their life
  - The drug free rule kicks in the day after the shell breaks open \*\* (how currently labeled but most would not give this!!!)
- Access to outdoors- but sets no specific standards for the size of the outdoor area, the size of the door leading between inside and outside, or the amount of time the birds spend outdoors.

Aviagen





## The Challenges involved in ABF Production

Aviagen

## Going ABF in the USA Learning Curve

- On average:
  - Total mortality will be higher than normal
  - First week mortality 1.5%, occasionally much higher
    - Conventional <1.0%
  - More NE reported
  - Condemnations are usually higher in ABF grown birds

All companies experience a learning curve to some degree. Successful companies guard what they've learned.

Aviagen

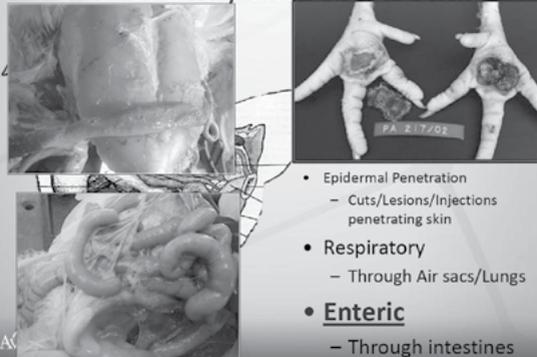
## Antibiotic Free (ABF) - Broilers

- What are the main challenges when on an ABF program?
  - Higher first week mortality (omphalitis/pericarditis-perihepatitis)
  - Necrotic Enteritis (NE)
    - Often a consequence of cocci vaccination and disbacteriosis
  - Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO, formerly known as FHN)
  - Vertebral Osteoarthritis (VOA)

**BACTEREMIA!!!- ALL Bacterial**

Aviagen

## Portal of Entry and Bacteraemia



- Epidermal Penetration
  - Cuts/Lesions/Injections penetrating skin
- Respiratory
  - Through Air sacs/Lungs
- **Enteric**
  - Through intestines

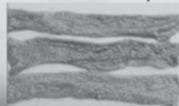
## First Week Mortality

- General Comments
  - Agristats was around 1.10%
  - US Industry:
    - Most PS Farms in USA do nothing to hatching eggs
      - No egg spray, egg dipping or fumigation
    - Most hatcheries using formalin in hatchers
    - Most broiler farms on re-used litter
- Expected first week mortality avg. on ABF is ~ 1.50%
  - Egg pack/Hatchery Sanitation/Brooding Management

Aviagen

## Necrotic Enteritis (NE)

- Depending on the ABF program you are on. In most cases at some point you will be using Coccidial Vaccines
  - Potential consequence is NE at 15-24 days when birds are going through heaviest cycling
  - Will often see a bump in mortality for 3-5 days
  - Are BCO and VOA secondary to this



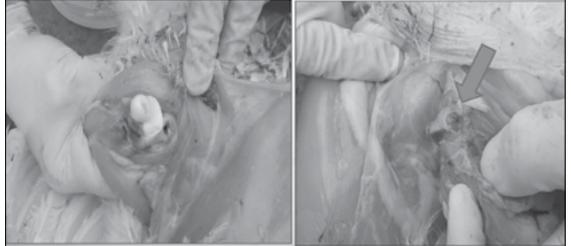
Aviagen

## BCO/FHN

- Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) , what used to be called Femoral Head Necrosis (FHN)
- Probably the most significant problem resulting from ABF programs
- Usually starts after 25-30 days of age
- Severe synovitis and/or osteomyelitis in the legs

Aviagen

## Femoral Head Normal vs BCO/FHN



Aviagen

## Vertebral Osteoarthritis (VOA)



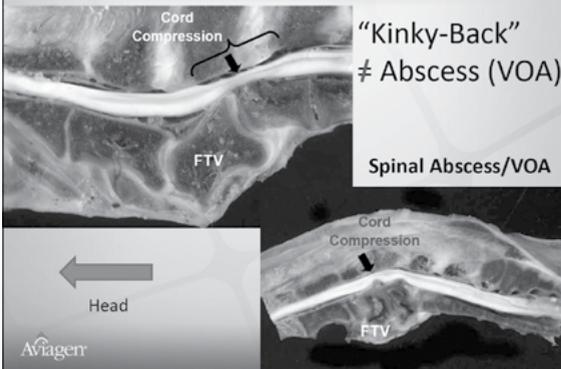
Aviagen

## Vertebral Osteoarthritis (VOA)

- Mostly caused by *E. cecorum*
- Seen mostly in broilers on “Drug Free Programs”
  - More often on re-used litter
- Males mostly affected
- Usually start 25-30 days
- Mortality can be as high as 20%
- Often only sign is spinal abscess
  - Spinal abscess (bone infection)

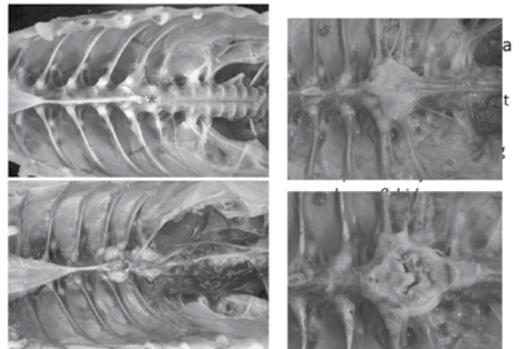
Aviagen

## Spondylolisthesis/“Kinky-Back”



Aviagen

## Abscess Location



## Management Changes

Aviagen

## Decrease Bacterial and Disease Challenges

- Good C&D
- Water sanitation\*\*\* ←
- Litter condition
  - Depth
  - Dry
- Minimize vaccine reactions (coccidial vaccine)
- Control other diseases, especially immunosuppressive diseases. CAV, IBDV, Marek's and mycotoxins
- Minimize stress in the birds

Aviagen

## Control Dysbacteriosis

- Some natural products like essential oils (i.e. oregano oil) said to have some antibacterial activity
- All veggie diets can see more watery droppings = wet litter
- Make sure the litter depth is deep enough!!!



Aviagen

## Control Footpad Burns (FPD)



Aviagen

## Other Interventions for Enteritis/NE

- NE vaccines?
  - Out there but not a lot of use
- Nutrition can be very important
  - Watch out certain feed ingredients
    - Wheat/Barley/Canola (rape)/etc.
  - Enzymes?
- Copper Sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) common to treat NE
- Control Coccidiosis!!!
- Butyric Acid?

Aviagen

## Coccidiosis Control

- “Bio-shuttle Program”- If on vaccine and can use Ionophores, give a low dose of Ionophore in the grower or grower and finisher feeds after the day old vaccination
  - This tempers the NE bump
  - 14-16 days most common age
  - Can't use on NAE Programs!!!

Aviagen

## How is this done?

Ref: Watt ABF Survey/Info 2014

- All major chicken growers say they are going to special lengths.
- "It's a time to be cleaner, cleaner, cleaner, so you don't introduce bacteria in the hatchery," said Bruce Stewart-Brown, senior vice president for food safety at Perdue.
- Switching to antibiotic-free poultry translates into about a 10% increase in production costs, according to C. Stephen Roney of the University of Georgia's Poultry Diagnostic and Research Center.
- Reduces over time?

Aviagen

## Overall ABF Conclusions

- All-vegetable diets seem to work best
- *Husbandry* plays a pivotal role in keeping flocks healthy
- Reduce bird density
- Maintain adequate downtime (>14 days for used litter)
- Litter management is critical to success
- Coccidial vaccination works - IF properly administered and.....
- Intestinal & litter microflora are involved, so new programs take some time to fully assess
- Not all programs work in all production complexes
- Alternative products have a role but strengths and weaknesses must be understood (Yeast Cell Wall, MOS, Probiotics)
- Although some products or combinations shows efficacy, it has to show economic return
- No product will work consistently without total program support including management

Aviagen

## 9 Keys to Successful ABF Production

Poultry health experts at a recent industry roundtable offered the following 9 suggestions for successful antibiotic-free production

Aviagen

### 1- Pay careful attention to flock management

- Lowering bird density and ensuring good access to food and water are especially important the first 7-10 days of life

Aviagen

### 2- Start with clean litter

- Control litter moisture to minimize coccidiosis pressure
- Make sure ventilation is adequate\*\*\*

Aviagen

### 3- Feed a course diet

- With high quality ingredients and not too much protein
- Make sure to avoid mycotoxins

Aviagen

#### 4- Control House Temperature

- To modulate feed consumption, which can help reduce necrotic enteritis (NE)

Aviagen

#### 5- Beware of unproven feed additives

- There is no “silver bullet” product that will prevent NE, although enzymes that increase the digestibility of starches can be beneficial for ABF flocks on an all-vegetable diet

Aviagen

#### 6-Inspect hatchery equipment

- To make sure all chicks are vaccinated effectively
- Try to use coccidiosis vaccines well before their expiration date

Aviagen

#### 7- Preserve efficacy of coccidiostats

- Of synthetic/chemical anticoccidials by using them sparingly
- Never rotate to a synthetic/chemical that is in the same class as the one you were using
- Nicarbazin very slow to develop resistance

Aviagen

#### 8- Stay Flexible

- If birds in ABF programs start experiencing NE problems, it may be necessary to move the operation to another location

Aviagen

#### 9- Have a back-up plan

- If ABF birds get sick, it may be necessary to switch them to conventional production so they can be treated effectively with antibiotics

Aviagen

## The Future FOR ABF USA

- More and more ABF?
  - The ones who got in early got the better contracts (prices)
  - Need to learn to manage ABF
  - Ionophores? Here to stay?
  - Better and available coccidia vaccines
- Need to identify interventions to decrease the incidence or impact of NE, BCO and VOA.
  - Probiotics/Prebiotics, feed ingredients, immunomodulators , NE vaccine, etc.
    - Companies very secretive about these products

Aviagen

## The Future for ABF - USA

- Check your water and water lines.
  - This is probably one of the most effective ways to control pathogens in the house.
  - Have a water line C&D protocols during downtime.
  - Maintain you water clean and free of pathogens.

Aviagen

## The Future for ABF - EUROPE

- As many EU countries had already shown significant Antibiotic Use Reduction focus on antibiotic reduction strategies (no prophylactic use)
- Countries not showing reduction – ABF?
- Ionophores future?
- Continued pressure on antibiotic use
- Alternative means of bacterial control

Aviagen

## Grazie



Aviagen

# GESTIONE E PROBLEMATICHE DELL'ALLEVAMENTO AVICOLO ANTIBIOTIC-FREE NEGLI USA

Heckman D.

USA

*The Importance of Balanced Decision Making*

*A Case Study on Raised without Antibiotics (RWA) in the USA*

David D. Heckman  
Global Poultry Consultant  
May 2018

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

Elanco

© 2018 Elanco and Company. An subsidiary of Elanco.

### Discussion Objective

Share info from the US poultry market as a case study to reinforce what you are already doing around the raising & marketing of broiler chickens

Elanco © 2018 Elanco and Company. An subsidiary of Elanco.

### Summary of Key Learnings from US Experience

Acknowledge

Lead

Create

Elanco © 2018 Elanco and Company. An subsidiary of Elanco.

### Learnings from US Experience

- Acknowledge** change....the opportunity exists to meet needs of different customer segments
- Create** space for producer & consumer choice
- Lead** on 2 Fronts
  - Decisions which meet needs of all
    - Food affordability
    - Bird health & welfare
    - AMR impact
    - Sustainability & resource utilization
  - Market poultry based on building on the positives of the category, not on differentiating on 'food safety'

Elanco © 2018 Elanco and Company. An subsidiary of Elanco.

### US Production through 3 Lenses

Producer

Food Marketer

Consumer

Branding, New Marketing, Promotion, Training Support

Elanco © 2018 Elanco and Company. An subsidiary of Elanco.

### US (RWA) through 3 Lenses

Producer

Food Marketer

Consumer

Branding, New Marketing, Promotion, Training Support

Elanco © 2018 Elanco and Company. An subsidiary of Elanco.

## Clarity around the Regulatory Framework



- Ionophores as Antiparasitics
- Can use ionophores if marketing an AB-free label in Europe



- Ionophores as Antibiotics
- Cannot use ionophores if marketing an RWA label in US
- **Cannot** use "AB-Free" Label
  - By law, all broiler meat must be free of antibiotics before it can be sold
- Can use
  - "RWA" (Raised without Antibiotics)
  - "NAE" (No Antibiotics Ever)



## US Broiler Production

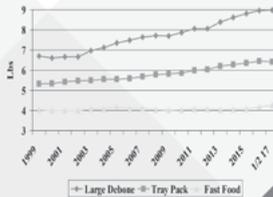
- Strong integrator, retailer, & food service brands
- Size of US integrators allows segmentation
- Production management areas focus
  - Nutrition (maize v wheat) highlights different disease mgt practices
  - Efficiency Focus: volume v technical optimization



## Production Overview

### 3 Main Types of Production

- 1) Large Bird Deboned (3.7-4.5 kg)
- 2) Tray/Family Pack (2.6-3.2 kg)
- 3) Fast Food/Small Bird: (1.7-2.2 kg)



## Production Overview

Category	Avg Wt (kg)	Market Focus	% of Category that is RWA
Large Bird Deboned	4.2	Further processed	18%
Tray Pack	2.9	8-9 pc cut-up; Branded family packs	61%
Small Bird	1.9	Specialty food service, retail	49%

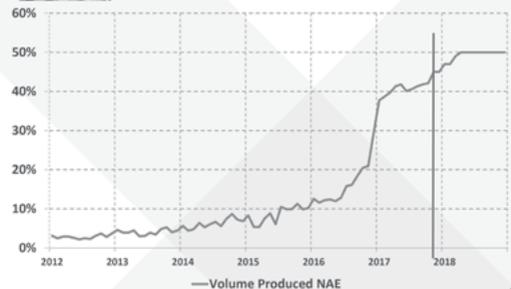


## Antibiotic Use: 3 Segments in US Poultry Production

1. Conventional
2. Animal-Only Antibiotics Use/WHO Guidelines
  - Use of antibiotics, but no Shared Class (antibiotics used in both humans and animals)
3. Raised without Antibiotics (RWA)/ No Antibiotics Ever (NAE)
  - Whole bird or breast meat marketed as RWA
    - Back half of chicken marketed into Segment 1
  - Birds needing treatment back into Segment 1



## US Broiler Production RWA Trends



## RWA: Impact to KPIs



- Lower flock density = Less kgs produced per barn
  - 5% - 15% Reduction in Density
- Longer time between flocks (Disease control measures)
  - 20% Increase in downtime
- Longer grow-out period
  - 4% increase
- Requires more feed to produce a kg of meat
  - 6% increase
- Higher mortality rates
  - 20% - 50% higher
- Potential for more birds treated with shared class medically important drugs (treatment rate)
  - 0% - 15%

Elanco ©2018 Elanco and Company. An subsidiary or affiliate. Salois, et al, 2016

## RWA: Producer Economics

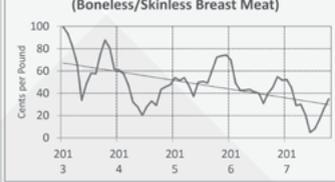


### The Facts

As more producers enter the RWA market, price premium eroding

- 2013 producers receiving \$1.00 premium for RWA
- By mid-2017, price premium was < \$0.10
- Trend continues downward

### Premium for RWA vs Conventional (Boneless/Skinless Breast Meat)



Blue Line: Monthly premium  
Black Line: Trend line

Elanco ©2018 Elanco and Company. An subsidiary or affiliate. Scholer, ExpressMarketsInc, Feb 2018

## RWA: Producer Economics



### Supply & Demand

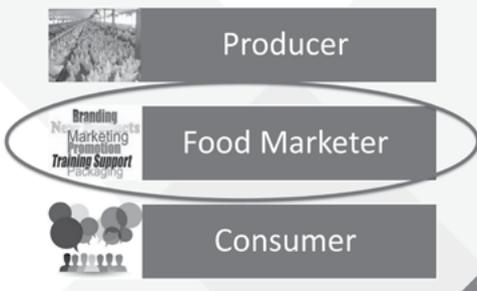
As increasing volumes enter the RWA niche, the price/kg paid to the producer is decreasing



$R^2 = 0.8387$

Elanco ©2018 Elanco and Company. An subsidiary or affiliate. Scholer, Express Markets Inc, Feb 2018

## US (RWA) through 3 Lenses

Elanco ©2018 Elanco and Company. An subsidiary or affiliate.

## Marketing of Poultry Products in the US



- Strong integrator & Strong retailer brands
- Supply chain power varies
- Food marketing companies often work with 2-3 poultry companies on longer-term contract basis
- What will happen when current RWA contracts up for renewal?

Elanco ©2018 Elanco and Company. An subsidiary or affiliate.

## Marketing Poultry Products in the US

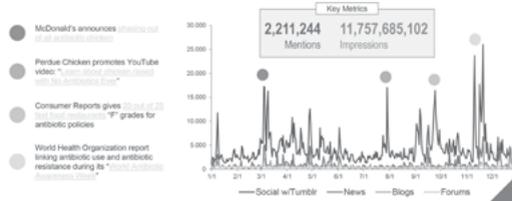


- All about Differentiation
  - Slow growth (1-2%) in traditional categories
  - Fast growth (10+%) in newer/niche categories
- Several long-standing food retailers (McD, Subway) face challenges
  - Multiple changes to business model
  - 3 N's: Novelty, Niches, milleNials

Elanco ©2018 Elanco and Company. An subsidiary or affiliate.

## Does niche marketing build a Brand

- Experience/social media/mkt data shows an impact
- Frequently, that impact
  - Is short term
  - Turns into a commodity offer as multiple players enter
  - Not sustainable ("How do we back out of this", US retailer)



Elanco 2018 El Lilly and Company. An subsidiary or affiliate. Elanco Pulse Institute, 2017

## US RWA through 3 Lenses



Elanco 2018 El Lilly and Company. An subsidiary or affiliate.



## US Consumer

### The Center for Food Integrity

- Annual research
- Food & "Lifestyle" issues
- 10 year database
- 50+ topics examined



Elanco 2018 El Lilly and Company. An subsidiary or affiliate.



## 2018 Survey: 4 of 6 Top Issues Food-Related



Center for Food Integrity, Feb 2018

Elanco 2018 El Lilly and Company. An subsidiary or affiliate.



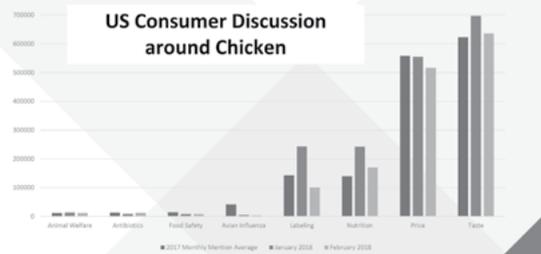
## US Consumer Food Focus



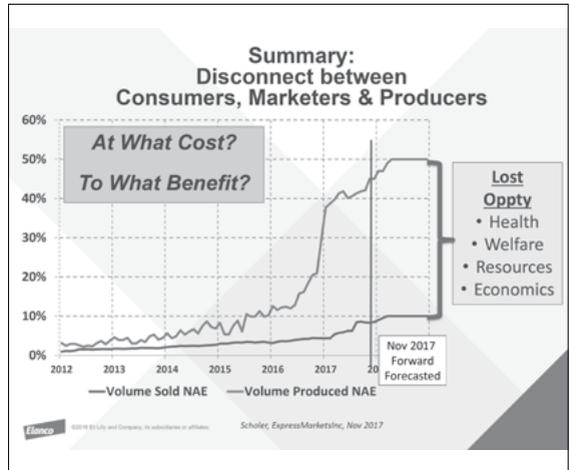
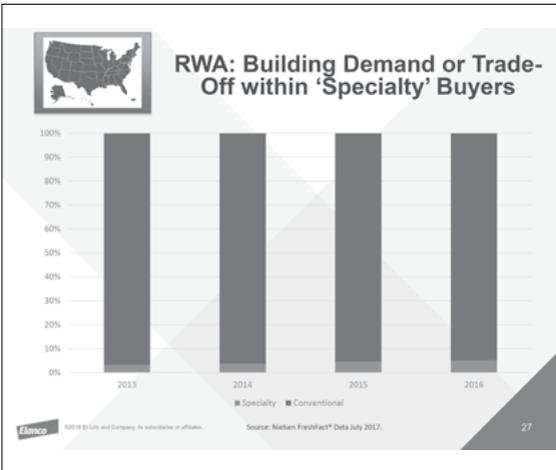
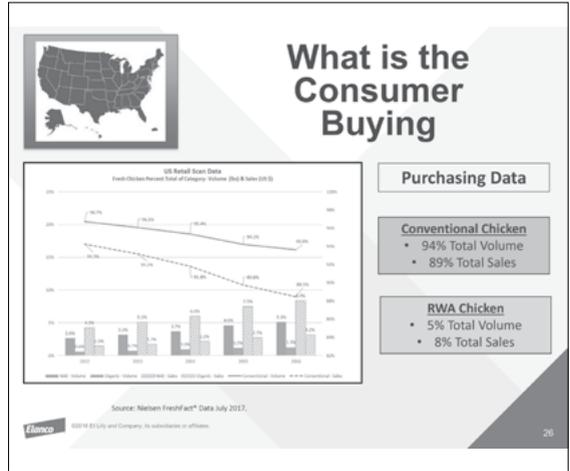
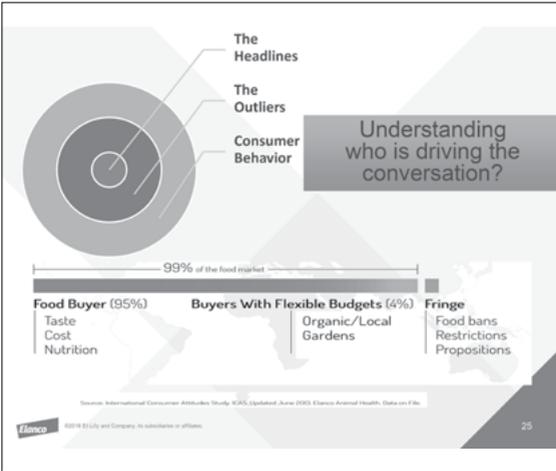
Elanco 2018 El Lilly and Company. An subsidiary or affiliate.



## Putting things into Perspective



Data from Elanco Pulse Institute, accessed 19-Apr 2018

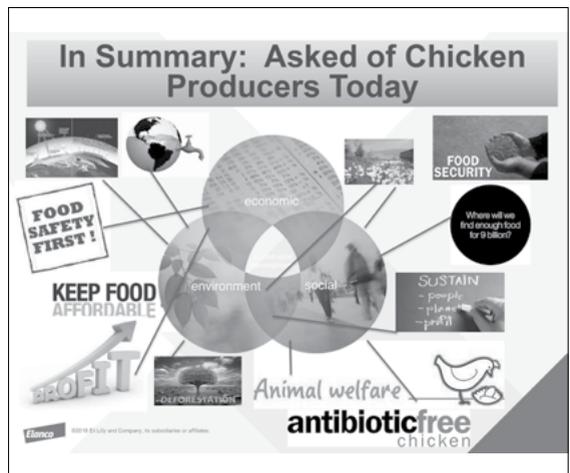


### Future of RWA in the US: Rennie Study 2-May 2018

- 'There are signs US broiler industry may be finding middle ground'
- "At some point the ionophores will come back because there's not a lot of tools left in the toolbox.....some poultry companies are testing to see how successful they can be with a NAE program."
- "I think ionophores will always be part of the mix [for coccidiosis management]" Rennie said. "But right now, people are trying to play with these NAE programs"

US, Rennie, <http://www.thepoultrysite.com/poultrynews/40036/rennie-nae-programs-represented-40-of-us-broiler-flocks-in-2017>, Accessed 7-May 2018

©2018 Elanco and Company. Its subsidiaries or affiliates.



## A History to be Proud Of

Today, 56B chickens deliver 3x more meat/person than just 40 years ago

1972  
74 grams/week

2010  
244 grams/week

Adapted from FAO, FASOSTAT. Reproduced for copyright. Accessed Feb. 27, 2014.

**Elanco** ©2014 El Lilly and Company. Its subsidiaries or affiliates. 31

## Tremendous Story

Efficient Innovative

In the Last 45 Years,  
(U.S.) Broiler Producers have Dramatically Reduced \*

WATER DEPLETION BY 53%

LAND OCCUPATION BY 71%

GLOBAL WARMING POTENTIAL BY 30%

TERIMA, MATHIJK AND PRITSMAK, 2016

\*BASED ON 1 KG LIVE WEIGHT

**Elanco** ©2014 El Lilly and Company. Its subsidiaries or affiliates. 32

## We are at risk of losing these gains

WATER DEPLETION BY 53%

LAND OCCUPATION BY 71%

GLOBAL WARMING POTENTIAL BY 30%

TERIMA, MATHIJK AND PRITSMAK, 2016

\*BASED ON 1 KG LIVE WEIGHT

**Elanco** ©2014 El Lilly and Company. Its subsidiaries or affiliates. 33

## A lot is being asked of Chicken Producers Today

Comprehensive solutions require system-wide approaches vs. issue by issue approach

KEEP FOOD AFFORDABLE

FOOD SAFETY FIRST!

SUSTAIN - people - planet - profit

Animal welfare antibioticfree chicken

Where will we find enough food for 9 billion?

**Elanco** ©2014 El Lilly and Company. Its subsidiaries or affiliates.

## Thank You !

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA WORLD VETERINARY PATHOLOGY ASSOCIATION

**Elanco** ©2014 El Lilly and Company. Its subsidiaries or affiliates. 35

## **ATTUALITÀ SULL'USO DEGLI ANTIBIOTICI NELL'ALLEVAMENTO AVICOLO ITALIANO: AZIONI INTRAPRESE E SVILUPPI FUTURI**

Pedicone R.

*Unaitalia, Roma*

L'antimicrobico resistenza è un fenomeno che desta grandi preoccupazioni. L'Italia è sotto i riflettori, sia per quanto riguarda l'uso di antibiotici in campo umano che in campo zootecnico; in particolare, il settore avicolo è fatto oggetto spesso di attenzioni mediatiche che non tengono conto dello sforzo che l'avicoltura italiana ha intrapreso negli ultimi anni. Consapevole della necessità di un uso razionale, nonché di una riduzione volta a diminuire la pressione selettiva, Unaitalia, in collaborazione con SIPA, si è fatta promotrice di un Piano volontario, divulgato nel 2015 dal Ministero della Salute a seguito di valutazione favorevole di un gruppo di lavoro che coinvolge anche il CRAB (Centro nazionale di riferimento per l'antimicrobico resistenza). Gli obiettivi del Piano (-15% del 2015 e -40% nel 2018 rispetto all'anno di riferimento 2011) sono stati colti pienamente e con largo anticipo (2016). Ciò, unitamente al cambio di scenario (One health), ha portato all'elaborazione di un Piano per gli anni 2017- 2018, mutuando i medesimi obiettivi messi in evidenza nel Piano Nazionale per il controllo dell'antimicrobico-resistenza (PNCAR): -30% e colistina a 5 mg/PCU nel 2020, uso solo in caso di effettiva necessità di CIAs (antibiotici criticamente importanti per l'umana). Il nuovo Piano prevede l'abbandono della colistina nei broiler già nel maggio del 2017, mentre siamo in linea con la riduzione generale; in evidente miglioramento i risultati su macrolidi e fluorochinoloni. I nostri dati sono validati, dal 2015, da un ente terzo di certificazione. L'essere in filiera consente, inoltre, di disporre del dato di consumo in tempo reale.

Unaitalia è titolare di un disciplinare di etichettatura volontaria autorizzato dal Mi-paaf, l'unico che dà la possibilità di etichettare le carni con l'informazione "allevato senza uso di antibiotici", qualora si sia conformi ad una serie di controlli e requisiti, fra cui spicca quello di non aver mai utilizzato antibiotici in allevamento, fin dalla fase embrionale in incubatoio. Ben 14 aziende aderenti stanno utilizzando questa informazione, tuttavia il nostro obiettivo è quello di un uso corretto del farmaco antibiotico, non certo quello di eliminarne l'uso. Gli antibiotici restano uno strumento di progresso fondamentale e, per questo, vanno salvaguardati.



## NUOVI STRUMENTI DECISIONALI PER UN USO PRUDENTE DEGLI ANTIBIOTICI

Catania S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTI Verona-Vicenza, via San Giacomo 5, 37157 Verona (VR), Italy*

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta la capacità dei batteri di resistere a determinate molecole antimicrobiche, e risulta essere il frutto di un adattamento naturale delle specie microbiche alle avverse condizioni, permettendo quindi alle generazioni future di mantenere la specie. Tale meccanismo di sopravvivenza, già ipotizzato da Fleming, ha permesso a numerose specie batteriche di raggiungere resistenze multiple ai farmaci determinando un allarme globale riguardante la perdita di efficacia delle molecole antimicrobiche. È sempre più evidente, ed è ormai considerato un concetto acquisito, che la resistenza batterica agli antimicrobici rappresenta un problema globale che va affrontato in una logica collaborativa ispirata al concetto di "One-Health", secondo il quale la salute umana e animale vanno tutelate senza settorialismi e senza prescindere dal contesto ambientale. Per tale motivo diverse attività sono state proposte al fine di limitare lo sviluppo ed il mantenimento delle resistenze antimicrobiche, in particolare il contenimento dell'utilizzo degli antimicrobici o il loro appropriato utilizzo risultano essere il perno fondamentale del sistema, e sicuramente in questo contesto la parte veterinaria può giocare e svolgere il proprio ruolo. In particolare l'utilizzo appropriato del farmaco in medicina veterinaria ed in particolare nel settore avicolo industriale è stato considerato come una importante sfida. Tale sfida in un primo tempo è stata vista come efficacia stessa del farmaco, finalizzata ad una riduzione delle perdite economiche con un intrinseco concetto zootecnico/produttivo, ma man mano che la consapevolezza di una medicina unica (*One Health*) e la responsabilizzazione della produzione di alimenti destinati al consumo umano hanno preso corpo tale approccio zootecnico/produttivo ha lasciato gradualmente il posto ad un approccio maggiormente consapevole ed oggettivo indirizzato verso una medicina unica. Quindi il ruolo del medico veterinario prescrittore diviene sempre più delicato e fondamentale, per svolgere oltre ai compiti ampiamente conosciuti, anche quello di partecipare in maniera attiva alla riduzione dell'antibiotico resistenza attraverso l'utilizzo consapevole e ponderato del farmaco basando la scelta terapeutica su basi oggettive.

Per tale motivo L'Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie ha negli anni passati standardizzato e messo in attività routinaria la metodica MIC (Minima Concentrazione Inibente) mediante il metodo delle microdiluizioni in brodo. Dal gennaio 2017 l'IZSve ha introdotto routinariamente la tecnica della MIC nei protocolli diagnostici eseguiti negli animali da reddito. Questo nuovo servizio ha permesso di fornire al medico veterinario clinico informazioni più dettagliate e precise finalizzate a supportare una scelta corretta ed oggettiva dell'eventuale trattamento farmacologico.

Tale metodica ha sostituito il vecchio sistema di rilevazione di sensibilità agli antibiotici basato sulla metodica Kirby-Bauer.

La scelta di sostituire il metodo in uso è legata al fatto che mentre il KB fornisce solamente un dato qualitativo (sensibile *vs* resistente), la metodica MIC permette, mediante la comparazione dei valori rilevati con specifici valori denominati *breakpoint*, di classificare l'isolato batterico come sensibile o resistente, ma nel contempo permette anche di avere un dato quantitativo, utilissimo nella scelta appropriata del farmaco.

Il servizio fornito dall'IZSVE è andato oltre all'aspetto analitico e grazie alle nuove tecnologie informatiche abbiamo potuto creare una banca dati consultabile da ogni medico veterinario mediante inserimento di username e password (<https://www.izsvenezie.it/antibiotico-sensibilita-report-mic/>).

Questo nuovo servizio permette al medico veterinario di controllare in tempo reale tutti le sue analisi con metodica MIC riguardanti i propri casi clinici, potendo correlare a questi l'allevamento di provenienza o la struttura della filiera. Tale possibilità permette quindi di utilizzare un dato storico di MIC per impostare protocolli terapeutici appropriati e maggiormente efficaci. Il monitoraggio periodico in allevamento eseguendo campioni ed analisi nel corso di eventi patologici permetterà da un lato di costruire un dato storico di allevamento, dall'altro di procedere celermente con la ricetta e una terapia appropriata ai primi sintomi di malattia. Tale sistema permette quindi al comparto zootecnico ed in particolare al settore avicolo di poter utilizzare in maniera consapevole il farmaco attraverso la valutazione di dati oggettivi, permettendo quindi una partecipazione attiva alla lotta globale verso le antibiotico resistenza.

## **USO DEGLI ANTIBIOTICI E BENESSERE ANIMALE: IL PUNTO DI VISTA DI ESSELUNGA**

Ferrari C.

### *Assicurazione Qualità Esselunga*

Da sempre Esselunga è attenta al tema del benessere animale e già alla fine degli anni '90 proponeva un Pollo Naturama allevato con una densità di animali inferiore agli allevamenti convenzionali (estensivo al coperto) ed un Manzo allevato in modo semibrado.

E' proprio in quegli anni che si verificarono crisi alimentari di grande portata, come la BSE o la contaminazione dei mangimi con PCB e Diossine in Belgio, che furono in grado di condizionare lo sviluppo delle filiere della Grande Distribuzione come anche l'evoluzione delle normative del settore alimentare.

Tema centrale delle Filiere Esselunga era quello della garanzia della sicurezza alimentare.

La filiera nasceva come un sistema di produzione "chiuso", in cui si implementava in ogni fase una tracciabilità e rintracciabilità molto accurata, costanti analisi di laboratorio, e una lista di allevatori e, più in generale, di "attori di filiera" validati e costantemente controllati.

Lo scopo, allora, era quello di fornire al Cliente rassicurazione della salubrità dei prodotti.

Parallelamente si è assistito a una rapida evoluzione del quadro normativo, teso a rafforzare la sicurezza alimentare e la rintracciabilità; ne sono solo un esempio il "Libro bianco sulla sicurezza alimentare" (2000), il Reg. (CE) 178/2002, i regolamenti del cosiddetto "pacchetto igiene" (Reg (CE) 852, 853 ed 854/2004), il Reg. (CE) 2073/2005, come anche le normative inerenti l'etichettatura delle carni bovine (Reg. (CE) 1760/2000) o di pollame (Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 29 luglio 2004).

L'applicazione di tali normative e delle filiere, che ha visto il grande impegno di tutti gli attori coinvolti, ha senza dubbio permesso di elevare il livello delle produzioni animali. La sicurezza alimentare è divenuta sempre più ciò che deve essere, cioè un pre-requisito.

Nel corso degli anni quindi si è assistito a un'evoluzione del concetto della filiera.

Oggi la qualità della filiera è un concetto molto più poliedrico. La sicurezza alimentare, come detto considerata giustamente e doverosamente sempre più un prerequisito, viene affiancata anche dalla necessità di fornire ai Clienti delle rassicurazioni in senso etico, sociale, ambientale.

Inoltre una nuova emergenza appare profilarsi, quella della resistenza agli antimicrobici, molecole utilizzate in campo veterinario, oltreché in medicina umana.

Nel contempo le filiere di aziende come Esselunga devono doverosamente essere rivolte anche alla fase di produzione a monte, con la precisa volontà di fornire degli spunti, degli stimoli a migliorare, innovare ed anticipare.

Per fare ciò è necessario condividere un ambito di partnership tecnica con le aziende fornitori-partner dei progetti che diano un contributo reale al miglioramento delle condizioni di produzione.

In un recente studio apparso su *Meat Science* (Maeve M. Henchion et al., 2017), gli autori hanno analizzato quali sono gli attributi di qualità che i consumatori di carne bovina considerano nella scelta del prodotto, classificandone 21.

Rimandando comunque all'articolo per tutti i dettagli, è importante notare alcuni aspetti; al primo posto appare l'origine del prodotto: tale aspetto, confermato anche dall'esperienza Esselunga, è in grado di fornire di per sé rassicurazioni al consumatore.

In terza posizione si trova tutto quello che è collegato alle certificazioni, alle informazioni comunicate in etichetta e al brand. Al sesto posto si colloca il benessere animale.

Confermando quanto espresso precedentemente, la sicurezza alimentare e la tracciabilità sono al 14° e 17° posto.

Le filiere di Esselunga, oggi, mantenendo un necessario presidio sulla sicurezza e sull'igiene delle produzioni, sono caratterizzate sempre più verso il benessere degli animali, la biosicurezza e utilizzo responsabile del farmaco, l'alimentazione degli animali, la sostenibilità, comunicando le caratteristiche dei prodotti e la loro origine attraverso etichette sempre più complete e "parlanti".

Il benessere degli animali è un tema di grande importanza: assicurare lungo tutta la filiera un elevato livello di benessere non solo contribuisce a produrre in modo salubre, ma è un principio morale di fondamentale importanza nei confronti di animali che vengono allevati per la produzione di alimenti.

Oggi come detto il consumatore è attento e sensibile verso questo aspetto.

Da un punto di vista normativo la protezione degli animali in allevamento e il loro benessere rappresentano uno degli obiettivi prioritari.

Negli ultimi decenni si è assistito infatti alla pubblicazione sempre più precisa di definizioni e norme specifiche.

Risale già agli anni Sessanta (Brambell Report, 1965) la definizione fondamentale delle cinque libertà per la tutela del benessere animale:

1. libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione
2. libertà dai disagi ambientali
3. libertà dalle malattie e dalle ferite
4. libertà di poter manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche
5. libertà dalla paura e dallo stress

Venendo agli ultimi anni il Decreto Legislativo 26 marzo 2001, n. 146, ha stabilito le misure minime da osservare negli allevamenti per la protezione degli animali.

In seguito sono state pubblicate leggi europee e nazionali specifiche per le condizioni di allevamento di polli da carne e galline ovaiole, vitelli e suini, che definiscono i requisiti strutturali, di gestione degli animali e della formazione del personale che si occupa degli animali stessi.

Considerando la resistenza agli antimicrobici, in linea con il "Piano d'azione

europeo “One Health” contro la resistenza antimicrobica” (Commissione Europea 2017), questa si può definire la capacità di microrganismi come i batteri di diventare sempre più resistenti a un antimicrobico cui erano precedentemente sensibili. La resistenza antimicrobica è una conseguenza della selezione naturale e delle mutazioni genetiche, mutazioni che vengono quindi trasferite, conferendo resistenza. Tale processo di selezione naturale è accentuato da fattori umani che facilitano la trasmissione di microrganismi resistenti, come l’uso improprio di antimicrobici nella medicina umana e veterinaria e condizioni e pratiche igieniche scadenti nelle strutture sanitarie o nella filiera alimentare. Nel tempo questi processi rendono gli antimicrobici meno efficaci e, in ultima istanza, inutili.

Sempre nello stesso documento è indicato che la Commissione intende continuare a promuovere modalità zootecniche anche per i sistemi di acquacoltura e di allevamento, e regimi alimentari che favoriscano un buon livello di salute e benessere degli animali per ridurre il consumo di antimicrobici.

E’ pertanto chiaro che biosicurezza, benessere e alimentazione degli animali, rivestono ruoli chiave per prevenire l’insorgenza delle patologie e per raggiungere un minore utilizzo dell’antibiotico.

Quando necessario, tuttavia, l’antibiotico deve essere utilizzato al fine di garantire la salute degli animali. Non si dimentichi infatti che tra le 5 libertà del benessere animale vi è proprio la libertà dalle malattie e dalle ferite. Pertanto non utilizzare, in caso di comprovato bisogno, un antibiotico contravviene in modo decisivo al benessere degli animali.

L’utilizzo, però, deve essere fatto seguendo modalità e strategie che non favoriscano l’insorgenza di resistenze batteriche. L’antibiotico è una risorsa che deve essere salvaguardata, anche perché lo sviluppo di nuove molecole è sempre più difficile. Per fare ciò, deve essere pertanto perseguito un utilizzo responsabile.

La vera priorità è quella appena descritta, e non quella legata alla presenza di residui nelle carni.

Non è infrequente infatti che possano nascere malintesi su questo aspetto.

L’esperienza di Esselunga nell’esecuzione di un numero molto elevato di campioni nel corso degli anni permette infatti di poter confermare che, grazie alla gestione dei tempi di sospensione, la presenza di residui nelle carni non rappresenta un pericolo nei confronti della sicurezza alimentare.

A livello nazionale e internazionale sono stati pubblicati numerosi documenti di indirizzo e linee guida riguardo il benessere, la biosicurezza e quindi l’utilizzo responsabile del farmaco.

Tali documenti sono stati utilizzati come preziosissimo strumento anche da Esselunga nel definire i requisiti di filiera.

Tra questi il Manuale di “Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia” (Ministero della Salute, 2012), il “Piano nazionale per l’uso responsabile del farmaco veterinario e per la lotta all’antibiotico-resistenza in avicoltura” elaborato dalla Società Italiana di Patologia Aviare, dall’Associazione UNAITALIA e dal Ministero della Salute, che ha già portato a una riduzione sensibile dell’uso degli antimicrobici, il “Manuale per la valutazione del benessere e della biosicurezza

nell'allevamento bovino da carne" elaborato dal Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia) e il "Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020" (Ministero della Salute, 2017), che per la prima volta fissa a livello nazionale degli obiettivi di riduzione totale dell'uso degli antibiotici, come anche di quelli ritenuti più a rischio per la salute pubblica (es. Fluorochinoloni, Cefalosporine di 3° e 4° generazione, Colistina).

Contestualmente, Esselunga è in contatto con il mondo delle Università e si impegna nel continuo miglioramento delle conoscenze, anche con studi di campo.

### **Le filiere Esselunga**

Attraverso documenti condivisi con le aziende fornitrici dei prodotti, le Specifiche Tecniche, Esselunga indica i requisiti dei sistemi di produzione, dalla fase di allevamento, alimentazione degli animali e fasi produttive presso stabilimenti di macellazione e lavorazione.

Vengono poi definiti piani di controllo, che comprendono anche i requisiti igienico sanitari dei prodotti.

Attraverso i propri veterinari vengono svolte visite presso le varie strutture di allevamento e lavorazione.

La carne viene ricevuta presso il Centro di Lavorazione della Carne bovina di Esselunga.

La carne bovina viene sottoposta a un periodo di frollatura in osso e poi, giornalmente, sezionata e disossata e inviata ai punti vendita.

Nel giugno 2017 è stato poi inaugurato uno stabilimento di produzione di hamburger.

Tutta la merce in arrivo viene verificata secondo i requisiti descritti nel Piano di Autocontrollo; vengono infatti eseguiti campionamenti per la ricerca di parametri microbiologici e chimici, come anche la verifica delle indicazioni di etichettatura e rintracciabilità.

Esselunga, prima catena della grande distribuzione, dal 2016 ha iniziato la commercializzazione di Pollo che non prevede l'utilizzo di antibiotici in allevamento. Questo importante risultato è stato raggiunto anche grazie al rigoroso rispetto delle condizioni di allevamento e di gestione degli animali tale da conseguire un livello di benessere e biosicurezza che contribuisce a mantenere gli animali stessi in buona salute.

In generale, i fornitori di Pollo Esselunga sono tutti impegnati nell'uso responsabile del farmaco veterinario, grazie al "Piano nazionale per l'uso responsabile del farmaco veterinario e per la lotta all'antibioticoresistenza in avicoltura" che, come detto, ha già portato a una riduzione sensibile dell'uso degli antimicrobici. A partire dall'aprile 2018 tutta la produzione di pollo Naturama avviene senza uso di antibiotici.

A tale proposito è necessario precisare che i cicli di animali che sono stati sottoposti a trattamento, la cui carne non può essere identificata con l'indicazione di allevamento senza uso di antibiotici, vengono comunque utilizzati in altre produzioni a marchio Esselunga.

Infatti, proprio grazie al Piano nazionale per l'uso responsabile del farmaco ve-

terinario, si hanno le garanzie che l'utilizzo dell'antibiotico avviene seguendo dei criteri tali da non favorire l'insorgenza di resistenze, che, come ampiamente detto, è la vera priorità.

Per quanto riguarda le Uova, tra quelle a marchio Esselunga (che provengono sempre da allevamento a terra o all'aperto) vi sono uova da galline allevate a terra e senza l'utilizzo di antibiotici. Inoltre anche per la produzione di paste fresche, prodotti da forno e pasticceria, prodotti di gastronomia, fabbricati nei propri stabilimenti, così come per alcuni prodotti da ricorrenza (es. Panettone, Pandoro e Colomba a marchio Le Grazie), vengono impiegati solo ovoprodotti derivanti da uova fresche da allevamenti a terra italiani.

Esselunga nel 2017 ha iniziato un'importante produzione di carne bovina, Scottona e Vitellone Naturama, il cui benessere è **valutato e garantito secondo lo standard del Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale (CReNBA)**.

La valutazione del benessere del bovino prende in considerazione sia le condizioni ambientali (management, alimentazione, strutture, attrezzature e condizioni microclimatiche) che la valutazione delle reazioni e dell'adattamento degli animali alle condizioni di allevamento (ad esempio è significativo osservare quando gli animali sono tranquilli ed è possibile potersi avvicinare a loro in modo naturale).

Solo gli allevamenti che superano una determinata soglia sono giudicati conformi ai requisiti di benessere animale previsto dallo standard CReNBA e possono essere inseriti come Fornitori della filiera.

A tale proposito anche i Veterinari di Esselunga sono qualificati come Valutatori del Benessere e della Biosicurezza ed eseguono visite presso allevamenti e macelli. A inizio 2018, l'assortimento di carne bovine con l'applicazione dello standard CReNBA, si è ampliato a una filiera di Vitello.

Grazie al "Disciplinare di etichettatura facoltativa delle carni bovine di Esselunga" tale indicazione è presente nell'etichetta, e il sistema è sotto il controllo del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Aut. IT012ET).

Anche per quanto riguarda l'allevamento dei suini, Esselunga ha sviluppato una filiera Naturama, basandosi sui principi del benessere animale e dell'uso responsabile degli antibiotici.

In allevamento, il rispetto degli aspetti di benessere più restrittivi della legge comprendono la fase di gestazione delle scrofe, completamente libera in box, il divieto di stabulazione su grigliato in fase di ingrasso e il divieto di azioni di mutilazione, quali taglio degli incisivi, e continua disponibilità di illuminazione naturale.

Un'attenta gestione della pulizia e sanificazione dei locali, nell'ambito di precise strategie di biosicurezza, contribuisce a un elevato standard sanitario che è un fattore essenziale per diminuire l'uso di antibiotici.

Nel caso in cui l'uso degli antibiotici diventi necessario al fine di curare gli animali, la filiera adotta un codice di uso responsabile, con la finalità di un utilizzo mirato per la patologia insorta, corretto nella dose impiegata ed efficace nel risultato, in modo che gli animali guariscano e nello stesso tempo l'antibiotico non perda efficacia a causa di fenomeni di resistenza.

L'antibiotico infatti è una risorsa importante e deve essere utilizzata nel modo più responsabile per preservarne nel tempo l'efficacia, sia in medicina umana che veterinaria.

Le terapie sono quindi scelte in base alla precisa diagnosi, da parte dei Veterinari, e di analisi di laboratorio per stabilire la sensibilità dei batteri ai farmaci scelti e vengono effettuate nel rispetto dei dosaggi e della durata appropriata.

Inoltre, nella scelta dei farmaci, sono stati presi in considerazione studi europei e internazionali e le più recenti disposizioni normative, al fine di evitare l'uso di famiglie di farmaci considerati di importanza critica nei confronti della medicina umana. Ad esempio, molecole appartenenti alle famiglie di Fluorochinoloni, Cefalosporine e Colistina possono essere utilizzate solo quando, in base ai criteri di scelta, non si hanno alternative e vi è quindi rischio di sofferenze degli animali. L'impiego dei farmaci viene costantemente registrato e il livello di azione monitorato, impegnandosi nella progressiva riduzione, in linea con il "Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020" a cura del Ministero della Salute.

## **CONCLUSIONI**

Esselunga è da sempre attenta alle produzioni animali.

Nel corso degli ultimi anni si è assistito a una evoluzione del concetto di qualità di filiera: dal tema centrale della sicurezza alimentare, eredità delle grandi crisi di fine anni '90, le filiere oggi devono considerare anche aspetti etici, sociali, ambientali e di sostenibilità. La sicurezza alimentare è giustamente considerata sempre di più un pre-requisito.

Le filiere devono da un lato rispondere alle aspettative del Cliente, mentre, nei confronti delle Aziende che condividono il progetto di filiera, l'approccio di Esselunga è il più possibile tecnico e scientifico, con la precisa volontà di fornire degli spunti, degli stimoli a migliorare, innovare e anticipare.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia)- "Manuale per la valutazione del benessere e della biosicurezza nell'allevamento bovino da carne"
2. Henchion Maeve M. et al.- "Beef quality attributes: A systematic review of consumer perspectives"- *Meat Science* 128 (2017) 1-7
3. Ministero della Salute - "Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia", 2012
4. Ministero della Salute - "Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020", 2017
5. Società Italiana di Patologia Aviaria, UNAITALIA, Ministero della Salute - "Piano nazionale per l'uso responsabile del farmaco veterinario e per la lotta all'antibiotico-resistenza in avicoltura"





2011

**ATTI DEL III SIMPOSIO SCIENTIFICO**

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Parma, 14 Settembre 2018



# OCCURRENCE OF B-LACTAM RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM THE BROILER PRODUCTION CHAIN

Apostolakos I., Fasolato L., Cuccato M., Ferrareso J., Rizzo R., Zago M., Piccirillo A.

*Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, Italy*

## Summary

In Italy, few studies have investigated the occurrence of  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* in broilers. This paper aimed to determine the level of phenotypic  $\beta$ -lactam resistance, in particular to third-generation cephalosporins (3GCs), in commensal and clinical *E. coli* isolated from the whole broiler production pyramid. To this end, several samples were collected from three production chains (A, B, C), including breeders, growing broilers and carcasses; and they were analysed on both Eosin Methylene Blue agar (EMB) and EMB agar supplemented with 1mg/L cefotaxime (CTX-EMB).

A low occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* was found when the non-selective medium (EMB) was considered. In contrast, for 55.3% of samples, at least one ESBL/AmpC-producing commensal *E. coli* was isolated when the selective medium (CTX-EMB) was used. Resistant strains were present at all steps of the broiler production pyramid with a relative sample frequency of ESBL/AmpC-producing *E. coli* ranging from moderate (15%) to extremely-high ratios (85%). In contrast to commensal *E. coli*, only 6.6% of clinical strains were phenotypically resistant.

The high occurrence of ESBL/AmpC-producers is surprising considering that 3GCs have never been licenced for use in poultry in Italy. Nevertheless, the circulation of 3GC-resistant *E. coli* in all steps of the broiler production pyramid is worrying. Studying the genetic background of  $\beta$ -lactam resistance is crucial to elucidate the source and the transmission routes of ESBL/AmpC-producing *E. coli* along the broiler production chain.

## INTRODUCTION

$\beta$ -lactams are essential antimicrobials in the armament of poultry veterinarians. Narrow spectrum penicillins are the most common  $\beta$ -lactams used for the treatment of necrotic enteritis (Landoni & Albarellos, 2015). Amoxicillin and ampicillin are penicillins with a broader spectrum and are frequently employed in colibacillosis cases (Löhren *et al.*, 2009). Administration of extended-spectrum  $\beta$ -lactams is prohibited in poultry in Europe since 2012 (European Commission, 2015). In Italy, third- and fourth-generation cephalosporins have never been licensed for use in poultry (EFSA/ECDC, 2016). Bacterial resistance to both penicillins and cephalosporins in poultry has been reported from a multitude of studies globally (Ewers *et al.*, 2012; Olsen *et al.*, 2014). Recent publications have demonstrated that poultry could represent a reservoir of determinants for  $\beta$ -lactam resistance and that the risk of transmission to humans via the food chain is not negligible (Overdevest, 2011). Of particular concern are 3GCs, which are categorized as critically important antimicrobials for humans. For this reason, the levels of ESBL/AmpC resistance in food-producing animals are being monitored yearly

by the EU (EFSA/ECDC, 2018).

In Italy, few studies have focused on the occurrence of  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* in the broiler industry and none has attempted to describe the problem with a comprehensive approach. In this paper, preliminary results of a monitoring aimed at determining the level of  $\beta$ -lactam resistance in commensal and pathogenic *E. coli* from the broiler production chain are presented.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sample collection*

In total, three production chains (chains A, B and C) were monitored from January 2017 to January 2018. Each chain corresponded to a breeder flock and for each breeder flock, four broiler farms and their carcasses were sampled. From each production chain, the following samples were collected: a) cloacal swabs from broiler breeders at the age of one-day-old and during the laying period at approximately 30 weeks of age (20 swabs/flock/sampling); b) cloacal swabs from broilers in commercial farms at the age of one-day-old and before slaughter at the age of approximately 30 days (20 swabs/flock/sampling); c) tissue samples (air sacs, lungs, brain, liver, pericardium) from chickens showing pathological lesions suggestive of colibacillosis (at least 10 dead birds); d) broiler carcasses after chilling at the slaughterhouse (20 carcasses/flock).

### *Isolation, identification and detection of $\beta$ -lactamase-producing *E. coli**

Samples from farms were directly streaked on Eosin Methylene Blue agar (EMB) and EMB agar supplemented with 1mg/L cefotaxime (CTX-EMB) and incubated at 37 °C for 24 h. Carcasses were analysed by both a qualitative and quantitative method. For the qualitative method, carcasses were rinsed with Buffer Peptone Water (BPW), rinsates were incubated (37 °C for 24 h) and streaked on EMB and CTX-EMB. For the quantitative method, rinsates and three serial dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-3}$ ) were streaked on EMB and CTX-EMB. Tissue samples were streaked only on EMB. A minimum of five suspect *E. coli* colonies was isolated from each sample and subjected to species confirmation by a combination of biochemical tests and PCRs targeting genus-specific housekeeping genes (McDaniels *et al.*, 1998). At least three confirmed *E. coli* isolates (minimum 2 isolated from EMB and 1 isolated from CTX-EMB, if positive) were screened for ESBL/AmpC production by combination disk diffusion test using cefotaxime and ceftazidime discs, with and without clavulanic acid and according to CLSI guidelines (CLSI, 2018). Additionally, a cefoxitin disc (30  $\mu$ g) was used to detect potential AmpC producers. Moreover, 62 strains (60 commensal and 2 clinical) isolated from chain B and showing phenotypic resistance or intermediate resistance to at least one cephalosporin were screened for narrow-spectrum  $\beta$ -lactam (ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid) resistance according to CLSI guidelines (CLSI, 2018).

### *Estimation of relative sample frequency of ESBL/AmpC-producing *E. coli**

The relative sample frequency of ESBL/AmpC-producing *E. coli* was established by identifying a sample as positive if at least one ESBL/AmpC-producing *E. coli* was isolated from it and was calculated for both isolation media

## RESULTS

### *Relative sample frequency of ESBL/AmpC-producing E. coli for CTX-EMB isolated strains*

At the top of the production pyramid (one-day-old PS chickens), extremely-high levels of ESBL/AmpC-producing *E. coli* were found with 85% positive samples for chain A and all (100%) samples positive for chain C. Due to time limitations, one-day-old PS chickens of chain B were not sampled. During the laying period, percentages dropped significantly (15% for both chain A and C), whereas sample relative frequency for chain B breeders was 30%. For broilers sampled in commercial farms, ESBL/AmpC-producing *E. coli* were found in high percentages on average (Table 1). Conversely, extremely-high sample prevalence was found for chain C at the age of one-day, which dropped significantly before slaughter (Table 1). At the bottom of the production pyramid, the prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in carcasses ranged from high to very high percentages (Table 1).

### *Relative sample frequency of ESBL/AmpC-producing E. coli for EMB isolated strains*

Significantly fewer positive samples were found when strains isolated from EMB were considered, except for the one-day-old PS chickens of chain A (Table 1). Moreover, for 14 out of 42 sampled flocks, the relative sample frequency was 0% (data not shown). For example, samples from PS chickens of chain B and C during the laying period were found negative on EMB, whereas on CTX-EMB the percentage of positive samples was 30% and 15%, respectively. Overall, when both media resulted in at least one positive sample per flock, the percentage of positive samples was seven times lower for EMB, on average.

### *Prevalence of clinical ESBL/AmpC-producing E. coli*

Out of 152 strains subjected to disk-diffusion test, 6.6% (n = 10) were found positive for ESBL (n = 5) and AmpC (n = 5) production. These isolates derived mainly from chain C (n = 7), breeders (n = 3) and broilers (n = 4).

### *E. coli resistant to narrow-spectrum $\beta$ -lactams*

Sixty-one out of 62 strains were found resistant to ampicillin with only one commensal *E. coli* being susceptible. In contrast, only two commensal *E. coli* strains showed resistance to the amoxicillin/clavulanic acid combination. Both clinical strains were resistant to ampicillin but susceptible to amoxicillin/clavulanic acid.

## DISCUSSION

A substantial difference between the two isolation methods was found with regard to the estimation of relative sample frequency of ESBL/AmpC-producing *E. coli*. To note, the absence of 3GC-resistant *E. coli* would have been found for 14 flocks, if only EMB without the addition of cefotaxime had been used. This finding is in line with the results from the EFSA/ECDC report (2016). Analysis of samples with the CTX-EMB isolation method revealed an overall high prevalence (55.3%) of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the broiler production chain. ESBL/AmpC-producing isolates were present at all steps of the broiler production pyramid for all the examined production chains, a finding described also in similar studies in Eu-

rope (Dierikx *et al.*, 2013; Nilsson *et al.*, 2014). Strikingly, extremely-high prevalence was identified in day-old breeders, suggesting a contamination of chicks at the hatchery. The significant reduction of ESBL/AmpC-producers during the laying period supports this; however, additional information is needed to verify this hypothesis. Prevalence in broilers ranged from high (37.5%) to extremely-high (76.3%) percentages indicating a well-established presence of 3GC-resistant *E. coli* in commercial farms. At the bottom of the production pyramid, carcasses were found highly contaminated with resistant *E. coli*, representing a risk of transmission to humans via the food chain (Overdevest, 2011). The median level of *E. coli* load in carcasses was approximately 3 Log CFU/ml for each chain considering the EMB counts, while the median level of contamination detected on CTX-EMB was near to the limit of detection (1 Log CFU/ml). However, some samples showed a load of *E. coli* enumerated on EMB+CTX over 3.5-4 Log CFU/ml.

The overall high occurrence of commensal 3GC-resistant *E. coli* in the broiler production pyramid becomes difficult to explain considering the prohibition of 3GC use in poultry in Italy. One possible explanation could be the persistent presence of resistant *E. coli* in the poultry environment (e.g. water, dust, flies), which results in the gut colonisation of chickens at the farm (Blaak *et al.*, 2015). A more probable explanation is the selection pressure exerted by the use of narrow-spectrum  $\beta$ -lactams leading to co-selection of 3GC-resistance (Dierikx *et al.*, 2013; EFSA/ECDC, 2016). The occurrence of penicillin resistance among cephalosporin-resistant *E. coli* found in our study supports this hypothesis and suggests that these strains may carry plasmids that harbour multiple resistance determinants.

Dissemination of 3GC-resistance determinants among clinical *E. coli* strains was detected but resistance remained at low levels, which is in agreement with the study of Niero *et al.* (2018) in Italy, while other studies reported higher resistance rates (Chalmers *et al.*, 2017; Ozaki *et al.*, 2017). However, the use of non-selective media could have negatively influenced the isolation rate of 3GC-resistant *E. coli*. Nevertheless, these strains could represent a potential risk not only for poultry but for public health as well, since a link between pathogenic lineages of human and avian *E. coli* has been proposed (Manges, 2016).

## CONCLUSION

This study demonstrated a high occurrence of 3GC-resistant commensal *E. coli* in the examined broiler production chains with extremely-high percentages at the top of the production pyramid. In contrast, dissemination of resistance determinants in clinical *E. coli* was low.

Phylo-typing of strains and genotyping of their resistance determinants is crucial to shed light on the transmission routes and reveal whether clonal (vertical) or horizontal transmission of ESBL/AmpC-producing *E. coli* occurs in the broiler production pyramid.

## BIBLIOGRAPHY

1. Blaak, H., van Hoek, A.H.A.M., Hamidjaja, R.A., van der Plaats, R.Q.J., Kerkhof-de Heer, L., de Roda Husman, A.M. & Schets, F.M. (2015). Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLoS One*. 10 : e0135402.

2. Chalmers, G., Cormier, A.C., Nadeau, M., Côté, G., Reid-Smith, R.J. & Borerlin, P. (2017). Determinants of virulence and of resistance to ceftiofur, gentamicin, and spectinomycin in clinical *Escherichia coli* from broiler chickens in Québec, Canada. *Vet. Microbiol.* 203: 149–157.
3. CLSI. (2018). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100.
4. Dierikx, C.M., van der Goot, J.A., Smith, H.E., Kant, A. & Mevius, D.J. (2013). Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the Broiler Production Pyramid: A Descriptive Study. *PLoS One.* 8: e79005.
5. EFSA/ECDC. (2016). EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*, 14.
6. EFSA/ECDC. (2018). EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal.* 16: 5182
7. European Commission. (2015). Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. *Official Journal of the European Union.* 299: 7–26.
8. Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S. & Wieler, L.H. (2012). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 646–655.
9. Landoni, M.F. & Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet. J.* 205: 21–27.
10. Löhren, U., Ricci, A. & Cummings, T.S. (2008). Guidelines for Antimicrobial Use in Poultry. In: Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H (Eds.), *Guide to Antimicrobial Use in Animals*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 126–141.
11. Manges, A.R. (2016). *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 22: 122–129.
12. McDaniels, A.E., Rice, E.W., Reyes, A.L., Johnson, C.H., Haugland, R.A. & Stelma, G.N. (1998). Confirmational Identification of *Escherichia coli*, a Comparison of Genotypic and Phenotypic Assays for Glutamate Decarboxylase and beta-d-Glucuronidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4113.
13. Niero, G., Bortolaia, V., Vanni, M., Intorre, L., Guardabassi, L. & Piccirillo, A. (2018). High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Vet. Microbiolol.* 216: 93–98.
14. Nilsson, O., Borjesson, S., Landen, A. & Bengtsson, B. (2014). Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *J. Antimicrob. Chemother.* 69: 1497–1500.
15. Olsen, R.H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B. & Christensen, H. (2014). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. *Avian Pathol.* 43: 199–208.

16. Overdeest, I. (2011). Extended-Spectrum B-Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1216–1222.
17. Ozaki, H., Matsuoka, Y., Nakagawa, E. & Murase, T. (2017). Characteristics of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis in commercial farms from a common hatchery. *Poult. Sci.* 96: 3717–3724.

**Table 1.** Relative sample frequency of ESBL/AmpC-producing *E. coli*

Production stage	Chain	% Relative frequency of isolation from EMB (range <sup>1</sup> )	% Relative frequency of isolation from CTX-EMB (range)
PS chickens (1-day)	A	85	85
	B	N.D. <sup>2</sup>	N.D.
	C	55	100
PS chickens (30-weeks)	A	5	15
	B	0	30
	C	0	15
Broilers (1-day)	A	8.8 (0 - 20)	58.8 (35 - 75)
	B	2.5 (0 - 5)	57.5 (25 - 95)
	C	23.8 (0 - 60)	76.3 (60 - 100)
Broilers (30-days)	A	3.8 (0 - 5)	37.5 (15 - 60)
	B	6.3 (0 - 20)	51.3 (35 - 95)
	C	3.8 (0 - 10)	40 (45 - 70)
Carcasses	A	5 (0 - 10)	61.3 (40 - 75)
	B	6.3 (5 - 10)	36.3 (15 - 50)
	C	5 (0 - 15)	56.3 (45 - 70)

<sup>1</sup>The mean prevalence from four sampled flocks was calculated for broilers and carcasses.

<sup>2</sup>Not determined.

# ELEVATA MORTALITÀ IN RIPRODUTTORI DI GALLINA FARAONA ASCRIVIBILE AD INTOSSICAZIONE DA ALOFUGINONE

Bottinelli M.<sup>1</sup>, Mainenti M.<sup>1</sup>, Paladino A.<sup>1</sup>, Zanardello C.<sup>2</sup>, Pozzato N.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 Verona-Vicenza, via San Giacomo 5, 37157 Verona (VR), Italy*

<sup>2</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS3 Diagnostica specialistica e istopatologia, via dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy*

## Summary

A high mortality event has been reported in a guinea fowl breeders premise in Northern Italy. Dead animals were necropsied in order to find out the aetiology of the phenomenon. Among the various findings, urate salt precipitates have been observed in kidney parenchyma later confirmed by the histopathological investigation. No pathogenic microorganisms were detected after bacteriological, virological, and parasitologic testing were performed. On the contrary, halofuginone traces were detected in the feed given to the animals, raising the hypothesis of a possible intoxication as the cause of the high mortality event on the farm.

## INTRODUZIONE

Gli episodi di elevata mortalità costituiscono un importante problema sanitario e gestionale negli allevamenti avicoli. Le cause possono essere molteplici: di natura infettiva, di natura ambientale o di natura tossica. L'alofuginone è un analogo dell'alcaloide febrifugina, isolato per la prima volta dalla pianta *Dichroa febrifuga*<sup>1</sup>, che viene comunemente utilizzato per il controllo della coccidiosi nell'industria avicola in tutto il mondo<sup>2</sup>. Sebbene esistano studi sulla tollerabilità della molecola nelle specie pollo e tacchino<sup>3</sup>, sono purtroppo scarsi i dati riguardo la tolleranza di questa nella gallina faraona, nonostante sia comprovata la sua tossicità sia nella pernice<sup>4</sup> che nell'anatra<sup>5</sup>. Nel presente contributo si riporta un caso di elevata mortalità a eziologia non confermata in un allevamento di riproduttori di gallina faraona concomitante al rinvenimento di alofuginone nel mangime.

### *Descrizione del caso:*

Nel Settembre del 2017 viene segnalato un evento di elevata mortalità (20% dei capi totali) presso un'azienda di riproduttori di gallina faraona, in cui erano presenti circa 15000 animali. L'anamnesi raccolta riferiva un improvviso calo dell'ovodeposizione concomitante ad una diminuzione dell'ingestione di alimento. I test per influenza aviaria sono risultati essere negativi. Al fine di meglio comprendere le possibili cause della mortalità ed escludere, in particolare, eventuali forme infettive, si è proceduto con gli approfondimenti diagnostici del caso.

## MATERIALI E METODI

### *Esame post-mortem e campionamento:*

Cinque carcasse di animali adulti, di ambo i sessi, sono state conferite presso la sezione di Verona dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe) per essere sottoposte a indagine necroscopica e a eventuali successivi approfondimenti diagnostici al fine di

escludere la presenza di agenti eziologici responsabili di malattia infettiva. Sulla base delle notizie cliniche e delle lesioni rilevate in corso di necropsia, da due carcasse sono state prelevate porzioni rappresentative del rene, dello stomaco muscolare, dell'ovidotto, fissate con formalina tamponata al 10% e inviate presso il laboratorio di diagnostica specialistica e istopatologia dell'IZSve per le indagini istopatologiche del caso. Sono stati inoltre prelevati campioni da ovidotto, cervello e rene, in seguito sottoposti a esami batteriologici in sede. Dagli stessi organi sono stati prelevati campioni da inviare presso il laboratorio di virologia speciale e sperimentazione dell'IZSve per eseguire indagini virologiche. Infine, il contenuto intestinale degli animali è stato utilizzato per eseguire esami parassitologici in sede.

#### *Esami batteriologici:*

Gli esami batteriologici sono stati effettuati seminando i campioni di organi in *Heart Infusion Broth* (HIB). Aliquote di HIB sono state successivamente seminate su agar sangue (AS), MacConkey agar (MCA) e *Bile-Esculin Agar* (BEA). Le piastre sono state incubate aerobicamente (AS e MCA) e in microaerofilia con CO<sub>2</sub> al 5% (AS e BEA) a 37 ± 1°C per poi essere esaminate dopo 24 e 48 ore d'incubazione. L'identificazione dei batteri cresciuti in piastra è stata effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche delle colonie, colorazione di Gram, test della catalasi e dell'ossidasi, e caratteristiche biochimiche.

#### *Esame parassitologici:*

Sono stati eseguiti esami coprologici qualitativi a fresco e mediante flottazione. Il primo esame prevede il posizionamento di una minima quantità di contenuto intestinale stemperato con una goccia d'acqua di fonte su di un vetrino portaoggetto, in seguito coperto da un vetrino coprioggetto. Il secondo esame prevede un passaggio preliminare di arricchimento mediante flottazione. Entrambi i tipi di preparazione sono stati osservati al microscopio utilizzando un obiettivo ad ingrandimento 20x.

## **RISULTATI**

I soggetti conferiti presentavano un buono stato di nutrizione. All'esame esterno, gli animali mostravano imbrattamento pericloacale con materiale di colore verde-biancastro, di grado variabile nei vari soggetti. All'apertura della cavità celomatica è stata riscontrata involuzione dell'ovidotto in tutti i soggetti. I quadri patologici osservati nei reni degli animali erano variabili; in particolare due soggetti presentavano lesioni puntiformi biancastre riferibili ad urati a carico del solo parenchima renale; in altri due soggetti, a carico dei reni è stato possibile apprezzare aree iperemico/emorragiche frammiste ad aree di aspetto rosa pallido. Nell'ultimo animale è stato rilevato un pallore renale diffuso. In tutti i soggetti, ad eccezione dell'ultimo soggetto descritto, è stato possibile rilevare la presenza di urati sulla superficie degli organi interni. Rare lesioni emorragiche focali e non erosive, di forma lineare od ovoidale, erano visibili sulla mucosa del ventriglio di due soggetti. In tutti i soggetti analizzati il contenuto dei ciechi era molto denso. E' stato riscontrato lieve pallore diffuso sul parenchima epatico in due soggetti insieme alla presenza di marcata neovascolarizzazione dei sacchi aerei addominali.

All'indagine istopatologica dei due campioni di tessuto renale conferito, è emersa fibrosi interstiziale con ispessimento della capsula glomerulare in presenza di focolai

multipli di congestione in un campione. In un secondo campione si sono apprezzati focolai multipli di necrosi dell'epitelio dei tubuli renali con aspetti di mineralizzazione degli stessi e presenza multifocale di cristalli aghiformi compatibili con urati. Dagli esami batteriologici, virologici e parassitologici non è stata rilevata alcuna presenza di agenti patogeni che potessero giustificare tale quadro sintomatologico ed anatomopatologico.

## **DISCUSSIONE e CONCLUSIONI**

Il quadro sintomatologico, congiuntamente ai riscontri patologici e alla negatività emersa dalle analisi effettuate, ha indirizzato il sospetto eziologico verso una causa di natura non infettiva. Un graduale miglioramento della situazione clinica, con arresto della mortalità, è stato ottenuto mediante somministrazione di una diversa partita di mangime. Il riscontro di tracce di alofuginone nell'alimento permette di ipotizzare un suo possibile ruolo nella patogenesi della *défaillance* renale acuta osservata in questi animali adulti. Dati gli esigui studi presenti in bibliografia, non si conoscono ancora il grado di tossicità e gli effetti avversi di questa molecola per la gallina faraona, sebbene, in soggetti giovani, sembri responsabile di una diminuzione dell'assunzione d'alimento e dell'accrescimento in assenza di mortalità<sup>6</sup>. Tuttavia, nel caso da noi descritto, si può ipotizzare che il particolare stato funzionale degli animali adulti (fase di riproduzione) abbia potuto influire sulla gravità dei risvolti clinici e patologici. Ci proponiamo, quindi, di approfondire il caso al fine di meglio chiarire il grado di tossicità di tale sostanza in questa categoria produttiva.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Pines M and Nagler A. (1998). Halofuginone: a novel antifibrotic therapy. *Gen. Pharmacol.* 30: 445-450. doi: 10.1016/S0306-3623(97)00307-8
2. Pinion JL, Bilgili SF, Eckman MK and Hess JB. (1995). The effects of halofuginone and salinomycin, alone and in combination, on live performance and skin characteristics of broilers. *Poult. Sci.* 74: 391-397. doi: 10.3382/ps.0740391
3. EFSA (European Food Safety Authority) (2003). Opinion of the Scientific Panel on additives and products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the re-evaluation of coccidiostat Stenorol in accordance with article 9G of Council directive 70/524/EEC, *the EFSA Journal*, 8: 1-45 (Adopted 13 November 2003.) [http://www.efsa.eu.int/science/feedap/feedap\\_opinions/186/opinion\\_feedap\\_04\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/feedap/feedap_opinions/186/opinion_feedap_04_en1.pdf)
4. Ernst RA, Vohra P, Kratzer FH and Kuhl HJ. (1996). Effect of halofuginone (Stenorol) on chukar partridge (*Alectoris chukar*). *Poult. Sci.* 75: 1493-1495.
5. Behr KP, Lukers H and Erhorn L. (1988). Anticoccidia Verträglichkeit des Wassergeflügels. *Deutsche Geflügelwirtschaft und Schweineproduktion* 40: 511-513.
6. EFSA (European Food Safety Authority) (2008). Cross-contamination of non-target feedingstuffs by halofuginone hydrobromide authorized for use as a feed additive. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, 657: 1-31.



# CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FILOGENETICA DI *ESCHERICHIA COLI* ESBL-PRODUTTORI ISOLATI DA POLLO

Brunetta R., Zandonà L., Bano L., Drigo I., Mazzolini E., Andreatta S., Catania S., Cocchi M., D'Este L., Pozzato N., Trevisiol K., Agnoletti F.

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

## Summary

The aim of this study was to investigate the molecular characteristics of 384 extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from 243 poultry farms located in Northeastern Italy. Most of bacterial isolates (73%) originated from meat chicken flocks and 23% from layer hens flocks and 4% from meat chicken breeder flocks. Bacterial strains were classified in seven different phylogroups (from A to F), but the most represented were the phylogenetic groups A and B1, which are typically environmental and commensal strains. The *mcr-1* gene was detected in the 4.7% tested strains. Thirty-three isolates were classified in 22 different sequence types (ST). One ST131 isolate belonging to phylogroup B2 and carrying the *mcr-1* gene is to be considered of zoonotic potential among the avian ESBL-producing *E. coli*.

## INTRODUZIONE

È ormai universalmente accettata l'idea che per risolvere o contenere il problema delle resistenza batterica agli antimicrobici sia necessario un approccio One-Health. Quest'ultimo considera uomo, animale e ambiente parte dello stesso sistema e studia le loro interazioni per una miglior comprensione di questo fenomeno biologico. Fra i batteri multiresistenti (MDRO) di maggior rilevanza per la salute umana il WHO (2017) elenca *Escherichia (E.) coli* in grado di produrre  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL). Questi enzimi conferiscono resistenza agli antibiotici  $\beta$ -lattamici, incluse le cefalosporine di III e IV generazione, e rappresentano una seria minaccia d'insuccesso terapeutico nei confronti di importanti infezioni umane sostenute da batteri Gram-negativi, comunemente trattate con cefalosporine (Chong et al., 2011). Alcuni studi documentano la possibilità che *E. coli* ESBL-produttori vengano trasmessi dagli animali, e in particolare dal pollame, all'uomo (Dierikx et al., 2013; Dahmas et al., 2015), ma esistono poche informazioni al riguardo in Italia.

La diffusione di MDRO Gram-negativi giustifica la recente rivalutazione terapeutica della colistina, considerata dal WHO (2016) farmaco di importanza critica per la cura delle infezioni umane sostenute da enterobatteri ESBL-produttori. Desta quindi particolare preoccupazione la descrizione del gene di resistenza alla colistina *mcr-1* (Liu et al. 2016), localizzato a livello plasmidico, recentemente segnalato in animali e uomo unitamente alle sue numerose varianti (Wise et al. 2018).

Per valutare la trasmissibilità di *E. coli* da animali all'uomo è necessario utilizzare metodi che consentono di caratterizzare gli isolati batterici ottenuti dalle diverse specie e di confrontarne l'omologia genetica. Fra questi risultano di particolare interesse la determinazione del gruppo filogenetico (Clermont et al., 2013) e il multilocus sequence typing (MLST) (Wirth et al., 2006).

Il primo è utile nell'accomunare ceppi che occupano determinate nicchie ecologiche o che si sono resi responsabili di patologie nell'uomo e negli animali; ad esempio, i gruppi filogenetici B2 e D sono stati associati a malattie che colpiscono l'uomo e il pollo mentre i gruppi A e B1 raggruppano ceppi ritenuti commensali o ambientali (Olsen et al., 2014). Il secondo consente la classificazione degli isolati batterici analizzati in sequence type (ST) che raggruppano ceppi geneticamente correlati. L'MLST si è dimostrato metodo d'elezione per studiare la diffusione di enterobatteriacee dotate di elevate resistenze agli antimicrobici (Woodford et al., 2011).

Scopo di questo lavoro era valutare la possibilità che allevamenti di pollame situati nel Triveneto possano fungere da reservoir di MDR *E. coli* potenzialmente trasmissibili al personale a contatto con gli animali ed al consumatore, valutando le caratteristiche genetiche degli isolati e comparandole con quelle dei cloni responsabili di patologia nell'uomo. A questo scopo sono stati utilizzati campioni conferiti alle sezioni diagnostiche dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) nell'ambito delle normali attività diagnostiche e di controllo, successivamente arruolati per la ricerca di *E. coli* ESBL-produttori. Gli isolati batterici collezionati nel corso della ricerca, condotta nel periodo 2016-2017, sono stati genotipizzati e sono stati determinati i loro pattern di resistenza nei confronti di un pannello di antimicrobici rilevanti per la terapia delle infezioni umane sostenute da batteri Gram-negativi. Infine si è voluta indagare la presenza dei geni di resistenza alla colistina *mcr-1* ed *mcr-2*, anch'essi di rilevante interesse per la sanità pubblica.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Per la ricerca di *E. coli* ESBL-produttori sono stati utilizzati campioni fecali e contenuti intestinali di pollo (broiler e ovaiole) conferiti alle sezioni diagnostiche di IZSVE nel periodo 2016-2017.

L'arruolamento dei campioni è avvenuto impiegando uno strumento informatico (*sample enrolment tool*: SET) che scansionava giornalmente le accettazioni delle sezioni diagnostiche di IZSVE. Per evitare l'overclustering era possibile prelevare campioni in un allevamento già arruolato nello studio, e identificato mediante il codice 317, solo dopo quattro mesi da un precedente campionamento, garantendo in tal modo l'arruolamento di un gruppo di animali diverso per gli allevamenti di polli da carne.

Ogni campione era rappresentato da animali dello stesso gruppo e quando il campione era rappresentato da più animali si procedeva alla preparazione di un pool di feci o contenuti intestinali; la positività o negatività del campione era quindi riferita al gruppo conferito al laboratorio e non ai singoli individui. Da ogni campione veniva selezionato in modo casuale un solo isolato *E. coli* ESBL-produttore per le successive analisi di laboratorio.

### *Esame batteriologico e caratterizzazione fenotipica dei ceppi di *E. coli* produttori di $\beta$ -lattamasi*

I campioni sono stati sottoposti ad arricchimento selettivo in *Brain heart infusion* broth addizionato con cefotaxime incubato a  $37\pm 1$  °C per 18-24 ore. Al termine del

periodo d'incubazione 10  $\mu$ L di brodocoltura venivano distribuiti per spatolamento sulla superficie di terreno *McConkey agar* addizionato con cefotaxime (McCC). In caso di crescita di colonie morfologicamente riconducibili ad *E. coli* si procedeva alla loro identificazione tramite MALDI-TOF (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) e ad un test di conferma mediante diffusione in agar utilizzando dischetti impregnati con i seguenti principi attivi: cefotaxime con e senza acido clavulanico, ceftazidime con e senza acido clavulanico, cefoxitina, cefepime e meropenem. I risultati venivano interpretati secondo gli algoritmi EUCAST che consentono di distinguere la resistenza ai  $\beta$ -lattamici di tipo ESBL o AmpC e di individuare ceppi resistenti ai carbapenemi (EUCAST, 2013).

#### *Genotipizzazione degli isolati batterici*

I ceppi di *E. coli* ESBL-produttori sono stati ulteriormente analizzati per la determinazione del gruppo filogenetico (Clermont et al. 2013) e una selezione di isolati batterici afferenti ai diversi gruppi filogenetici è stata indagata mediante MLST (Wirth et al. 2006). Per la determinazione del tipo di ESBL ed AmpC sono stati ricercati i geni TEM, CTX-M, CMY ed SHV e le loro varianti (Woodford et al. 2005; Dierikx et al. 2010). Infine in tutti i ceppi sono stati ricercati mediante PCR i geni di resistenza alla colistina a localizzazione plasmidica *mcr-1* (Liu et al., 2016) ed *mcr-2* (Xavier et al., 2016).

#### *Test di farmacosenibilità*

Per valutare la sensibilità agli antimicrobici dei ceppi di *E. coli* ESBL-produttori collezionati nel corso dello studio è stata determinata la minima concentrazione inibente nei confronti di un pannello di principi attivi di interesse in sanità pubblica umana. A questo scopo è stato utilizzato il metodo della microdiluzione in brodo (CLSI, 2015) impiegando un kit commerciale miniaturizzato (Sensititre ITGNEGF, Thermo-Fisher, TREK Diagnostic Systems) comprendente 18 principi attivi. Considerando le finalità del lavoro, che volevano evidenziare eventuali rischi di trasmissione di batteri multiresistenti dal pollame all'uomo, le MIC sono state interpretate utilizzando i breakpoint clinici umani (EUCAST, 2018). Ceppi con valori di MIC di imipenem, ertapenem e meropenem superiori al breakpoint di sensibilità clinica sono stati ulteriormente controllati per la conferma di resistenza ai carbapenemi utilizzando specifici test di diffusione in agar mediante dischetto (KPC/Metallo-B-Lactamase e OXA-48 Confirm Kit ROSCO, Taastrup, Denmark).

## **RISULTATI**

Nel corso dello studio sono stati esaminati complessivamente 384 gruppi di animali: 195 di broiler, 174 di ovaiole e 15 di riproduttori, provenienti da 243 allevamenti dislocati in Veneto (125 allevamenti), Friuli Venezia Giulia (40 allevamenti) e nelle province autonome di Trento e Bolzano (rispettivamente 5 e 73 allevamenti). I campioni risultati positivi per *E. coli* ESBL-produttori sono stati 191/384 (49,7%). Di questi 143/195 (73,3%) erano stati isolati da broiler, 40/174 (22,9%) da ovaiole, 8/15 (53,3%) da riproduttori. I campioni positivi per  $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC sono stati 77/384 (20%).

I gruppi filogenetici più rappresentati sono risultati l'A (52/191) e il B1 (52/191),

seguiti poi dall'F (21/191), dal C (20/191), dall'E (16/191), dal B2 (14/191) e dal D (10/191). Per 6 ceppi non è stato possibile determinare il gruppo filogenetico.

Tra i 191 ceppi di *E. coli* ESBL-produttori, 105 sono risultati positivi al gene CTX-M (100/105 di gruppo 1 e 5/105 di gruppo 9), 79 a TEM (unicamente TEM-1), 34 a SHV (tutte varianti 12), 55 a CMY il cui sequenziamento non ha permesso di discriminare tra le varianti 2, 22 e 61. Tre ceppi sono risultati negativi per tutti i geni di resistenza indagati.

In 78 isolati erano simultaneamente presenti più tipi di ESBL o AmpC. Le associazioni più comuni erano le seguenti: CTX-M-1 + TEM-1 in 41/191 isolati, CMY-2/22/61+ TEM-1 in 18/191 isolati, SHV-12 + TEM-1 in 113/191 isolati, CMY-2/22/61 + TEM-1 + CTX-M-1 in 3/191 isolati, CTX-M-1 + SHV-12 + TEM-1 in 2/191 isolati e TEM-1 + SHV-12 + CMY-2/22/61 osservata in un unico ceppo batterico. I ceppi portatori del gene *mcr-1* sono stati 9/191 (4,7%) mentre non è stato individuato in alcun isolato con presenza di *mcr-2*.

Utilizzando il gruppo filogenetico come criterio di selezione sono stati sottoposti a MLST 33 isolati batterici che sono risultati appartenere a 22 differenti ST. Tra questi 8 ceppi appartenevano a ST 429 e 2 ceppi a ciascuno dei seguenti: ST57, ST131, ST136, ST410 e ST2040. Tutti gli altri ST sono stati individuati in singoli isolati batterici.

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

## DISCUSSIONE

Il presente studio intendeva descrivere la variabilità molecolare di *E. coli* ESBL-produttori isolati da allevamenti di pollame del Triveneto, e non stimarne la prevalenza, che avrebbe richiesto un diverso disegno di studio. Allo scopo sono stati utilizzati sia animali sani che malati e metodi di arricchimento selettivo per aumentare la sensibilità dell'esame batteriologico.

Quasi la metà dei gruppi di pollame selezionati e conferiti ai laboratori IZSVE per scopi diagnostici o di sorveglianza permetteva l'isolamento di *E. coli* ESBL produttori e garantiva la variabilità molecolare della collezione di isolati. Questo risultato è tuttavia consistente con quanto descritto in Olanda da Dierikx (2012), che, utilizzando l'arricchimento selettivo per individuare *E. coli* ESBL-produttori, aveva trovato che il 100% degli allevamenti analizzati era risultato positivo, con prevalenze intra-aziendali anche superiori all'80%.

Sebbene la numerosità campionaria sia stata molto differente per le 3 tipologie produttive indagate (broiler, ovaiole e riproduttori), non consentendo valutazioni di tipo statistico e, tantomeno, stima di prevalenza, si è osservata una maggior percentuale di gruppi positivi per *E. coli* ESBL-produttori fra i polli da carne rispetto alle altre categorie (ovaiole e riproduttori).

Nel campione di isolati si è rilevata una notevole eterogeneità molecolare, infatti sono stati individuati tutti i gruppi filogenetici descritti in *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E ed F), sia pure con una predominanza dei gruppi A e B1; questi risultati sono allineati con quanto già osservato da Daehere (2018) nel pollame e da Eisenberger (2018) in vacche da latte. Sono risultati sporadici (14/191) gli isolati batterici appartenenti al gruppo filogenetico B2, responsabili di patologia nell'uomo (Olsen et al., 2014).

La ricerca dei geni di resistenza alla colistina ha permesso di individuare 9/191

(4,7%) *E. coli* ESBL-produttori portatori del gene *mcr-1*, fra i quali un isolato appartenente al gruppo filogenetico B2 e al ST131, clone considerato di successo e pandemico a livello mondiale, responsabile di gravi infezioni delle vie urinarie (UTI) nell'uomo. Al contrario, non sono stati individuati *E. coli* portatori del gene *mcr-2*, in accordo con quanto riportato in precedenti studi condotti nel pollame (Barbieri et al., 2017). Per quanto riguarda la resistenza agli antimicrobici nessuno dei 187 ceppi esaminati è risultato resistente ai carbapenemi e alla tigeciclina, farmaci critici per la salute umana, mentre è risultata elevata (43,3%) la percentuale di ceppi resistenti alla ciprofloxacina.

## CONCLUSIONI

Il nostro lavoro ha evidenziato la presenza di un'ampia varietà di geni di resistenza di tipo ESBL o AmpC, e delle loro varianti, diversamente associati fra loro, in *E. coli* ESBL-produttori isolati da habitat intestinale di polli allevati intensivamente nel Triveneto. L'identificazione del clone pandemico ST131, fenotipicamente resistente alla colistina e portatore del gene a localizzazione plasmidica *mcr-1*, merita attenzione per il suo potenziale significato zoonosico.

## RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato finanziato dal Ministero della Salute nell'ambito del progetto CCM2015 "Il modello One-Health per il contenimento delle resistenze microbiche di possibile origine zoonosica in sanità pubblica: sviluppo di un network medico-veterinario applicato alla prevenzione e controllo della circolazione di *Escherichia coli* produttore di ESBL, 2015-2018" e della ricerca corrente 12/14 IZSVE.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barbieri, N.L., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S., Nolan, L.K., Logue, C.M., 2017. *Mcr-1* identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PloS ONE* 12 (3) e0172997.
2. Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G., 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 413-431.
3. Chong, Y., Ito, Y., Kamimura, T., 2011. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 1499-1504.
4. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports* 5, 58-65.
5. CLSI, M07-A10, 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-tenth edition
6. Daehre K., Projahn M., Semmler T., Roesler U., Friese A., 2018. Extended-spectrum Beta Lactamase-/AmpC Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in broiler farms: Transmission dynamics at farm level; *Microbial Drug Resistance* 24 (2018) pp 511-518
7. Dahms, C., Hübner N.O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K., Kramer,

- A., 2015. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. PLoS ONE 10(11): e0143326.
8. Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., Mevius, D., 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. Vet. Microbiol. 145, 273-278.
  9. Dierikx C., van der Goot J., Fabri T., van Essen-Zandbergen A., Smith H., Mevius D., 2013. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68, 60-67
  10. Eisemberg D., Carl A., Balsliemke J., Kampf P., Nickel S., Schulze G., Valenza G., 2018. Molecular characterization of extended spectrum betalattamase producing *Escherichia coli* isolates from milk samples of dairy cows with mastitis in Bavaria, Germany. Microbial Drug Resistance, 24(4):505-510.
  11. EUCAST. 2013. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)
  12. EUCAST. 2018. Clinical breakpoints. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
  13. Liu, Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. The Lancet Infectious Diseases 16, 161-168.
  14. Niero G., Bortolaia V., Vanni M., Intorre L., Guardabassi L., Piccirillo A., 2018. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry in Italy. Vet Microbiol 93-98.
  15. Olsen, R.H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B., Christensen, H., 2014. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. Avian Pathol. 43, 199-208.
  16. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol 60, 1136-1151.
  17. Wise, M.G., Estabrook, M.A., Sahn, D.F., Stone, G.G., Kazmierczak, K.M., 2018. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. PloS ONE 13(4) e0195281.
  18. Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M., 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Rev. 35, 736-755.
  19. Woodford, N., Fagan, E.J., Ellington, M.J., 2005. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother 57, 154-155.
  20. World Health Organization (WHO), 2016. Critically important antimicrobials

- for human medicine. [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/antimicrobial-resistance/cia/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/cia/en/)
21. World Health Organization (WHO), 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
  22. Xavier, S., Lammers, C., Ruhhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malthotra-Kumar, S., Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 7; 21 (27)

Principio attivo	<0,064	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	%R
Amikacina						182		4			1			0,5
Gentamicina			138			9	4	36						21,4
Doripenem			187											0
Imipenem			186			1								0,5
Ertapenem			186			1								0,5
Meropenem		186			1									0,0
Cefotaxime					1		20	166						99,5
Cefepime			77			5	8	19	27	26	25			58,8
Ceftazidime					2	16	39	14	23	59	25	6	3	90,4
Colistina				160		7	7	5	4	4				7
Ciprofloxacina	70		14	22	13	4	4	60						43,3
Levofloxacina					123		2	14	48					35,3
Piperacillina/ tazobactam					134		32	18		3				1,6
Amoxicillina/ ac. clavulanico					6		20	55	106					56,7
Trimetoprim/ sulfamethoxazolo			101		5	3	6	72						41,7
Tigeciclina		128		50	7	2								0
Nitrofurantoina									179		5	3		1,6
Fosfomicina								175		5	3	4		3,7

**Tabella 1.** Risultati dei test di farmacossensibilità ottenuti attraverso la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) espressa in µg/mL. Le linee in neretto indicano i breakpoint clinici umani indicati da EUCAST.

## **COMPARAZIONE DEI PROFILI DI FARMACOSENSIBILITÀ DI *ESCHERICHIA COLI* ED *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLATI DA POLLI DA CARNE ALL'INIZIO E ALLA FINE DEL CICLO PRODUTTIVO**

Cauci C., Brunetta R., Di Martino G., Zandonà L., Dalla Costa A., Capello K., Stefani A.L., Moronato M.L., Gobbo F., Catania S., Bano L., Bonfanti L.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)*

### **Summary**

This study evaluated the level of antimicrobial resistance (AMR) in commensal bacteria isolated from healthy male broilers at the beginning and at the end of the production cycle. Animals were housed in 3 sheds of the same farm during two periods of the year (summer and winter), for a total of 6 experimental groups. *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were isolated from the intestinal contents collected from 25 day old chicks conferred for routine health monitoring plan and from 25 carcasses per shed after slaughtering. Microdilution panels of 13 molecules for *E. coli* (Thermo Scientific™ Sensititre™ NARMS Gram Negative Plate) and of 16 molecules for *E. faecalis* (Thermo Scientific™ Sensititre™ Gram Positive MIC Plate) were used to assess the minimal inhibitory concentration (MIC). Animals were treated either with Amoxicillin acid or Trimethoprim-sulfadiazine. Results showed a high variability of AMR among sheds, but a low variability within the strains isolated from the same animal-group sample. In *E. coli*, a significant AMR increase was observed at the end of the production cycle for Gentamicin, Ampicillin, Streptomycin and Trimethoprim-sulfamethoxazole. On the other hand, a decrease was revealed for Amoxicillin-clavulanic acid and Ciprofloxacin. In *E. faecalis*, a significant AMR increase was observed for Chloramphenicol and Tylosin. Further research will be needed to clarify the exact interpretation of these results.

### **INTRODUZIONE**

A livello nazionale vi è attualmente una carenza di dati sull'utilizzo di antibiotici nel settore avicolo nel corso degli ultimi anni associati all'antibioticoresistenza (AMR). Gli stessi dati ufficiali di AMR sono molto limitati, ma evidenziano una frequenza superiore al 95% delle resistenze ad almeno un principio attivo in *E. coli* (Ministero della Salute, 2016). EMA ed EFSA (2013) hanno individuato *E. coli* ed *Enterococcus faecalis* come utili indicatori di AMR negli animali da reddito, in quanto rappresentativi della popolazione di batteri commensali più frequentemente esposti agli antibiotici (AB).

Numerose evidenze scientifiche indicano un aumento di AMR nel pollo a seguito dei trattamenti (Simoneit et al., 2015), tuttavia questa connessione non è al momento supportata da dati certi. Alcuni studi hanno infatti evidenziato un aumento di AMR anche in capannoni in cui da oltre un anno non venivano somministrati antibiotici agli animali accasati (Smith et al., 2007; Ozaki et al, 2011). Gli studi sin qui condotti hanno valutato prevalentemente il livello di AMR a fine ciclo produttivo (ingrasso), mentre meno note sono le condizioni di partenza dei pulcini, legate alle condizioni di salute e gestione sia dei riproduttori sia degli incubatoi. Nei riproduttori i trattamenti

con AB potrebbero portare a una selezione di microrganismi resistenti che vengono trasmessi alla progenie, indipendentemente da una riduzione del consumo di AB nelle fasi d'ingrasso. Un riassortimento delle flore potrebbe avvenire anche in incubatoio qualora non venissero applicate accurate pratiche di disinfezione. Le resistenze agli antimicrobici possono essere valutate attraverso metodi genotipici o fenotipici. I primi ricercano direttamente geni di resistenza nei microrganismi in esame attraverso tecniche di biologia molecolare, i secondi si basano sul contatto diretto tra il microrganismo e l'antimicrobico e ne studiano il comportamento. Il test universalmente riconosciuto e codificato nella sua esecuzione da organismi scientifici internazionali (CLSI ed EUCAS) è il test della determinazione della minima concentrazione inibente (MIC). L'esistenza di breakpoint clinici definiti per le varie combinazioni specie animale (o uomo)/specie microbica/tipo di sindrome/antimicrobico, consentono di classificare il microrganismo testato come sensibile, intermedio o resistente a un determinato principio attivo, suggerendo al terapeuta il trattamento più appropriato. Inoltre, dato che il valore di MIC è espresso in termini quantitativi (mg/L o µg/mL), è possibile utilizzarlo per monitorare l'andamento delle farmacoresistenze nel tempo con osservazioni puntuali.

Obiettivo di questo studio era la valutazione dei profili di farmacosenibilità di *E. coli* ed *Enterococcus faecalis* isolati da gruppi commerciali di polli da carne a inizio e fine ciclo, provenienti da due diversi incubatoi e allevati in tre capannoni del medesimo allevamento.

## **MATERIALI E METODI**

### *Azienda oggetto della prova*

Il campionamento è avvenuto in due diversi periodi dell'anno (1. Giugno 2016 e 2. Dicembre 2016) presso una stessa azienda di polli da carne sita nel Nord-Est costituita da tre capannoni (A, B, C) che accasavano nella stessa settimana gruppi di circa 16.000-29.400 pulcini ROSS 308 a sessi misti (in rapporto circa 1:1). Sono stati identificati 6 gruppi sperimentali in base al capannone di provenienza e al periodo della prova: A1, B1, C1, A2, B2, C2. Secondo le consuete pratiche di allevamento per la macellazione delle femmine è stato effettuato uno sfoltimento a 33-35 giorni, mentre i maschi (sui quali sono stati effettuati i campionamenti previsti nel presente studio) sono stati macellati a 49-52 giorni di vita). I pulcini (45±4g) risultavano vaccinati per Malattia di Marek, Bronchite infettiva, Malattia di Newcastle. Gli animali di A1, B1, C1, C2 provenivano dal medesimo incubatoio X, mentre quelli di A2 e B2 dall'incubatoio Y. In tutti i capannoni la gestione dei parametri ambientali era effettuata tramite sistema centralizzato che garantiva il funzionamento degli impianti di raffrescamento, riscaldamento e ventilazione mantenendo la temperatura all'interno dei locali sulla base di intervalli di riferimento in funzione dello stadio di crescita. La lettiera era costituita da paglia pellettata sottoposta a fresatura quattro volte durante il ciclo. Sono stati utilizzati quattro tipi differenti di mangimi nel corso del ciclo in base all'età degli animali; il programma di alimentazione era il medesimo nei due periodi dell'anno.

### *Campionamento*

All'arrivo in allevamento e prima dell'accasamento, il proprietario ha effettuato un controllo dello stato sanitario delle partite, conferendo all'IZSVe 25 pulcini raccolti

casualmente dai gruppi destinati a ciascun capannone. Le carcasse conferite sono state sottoposte ad esame anatomopatologico e a eventuali accertamenti virologici, batteriologici o istopatologici a seconda delle lesioni osservate. In caso di positività all'esame batteriologico, è stato eseguito il test di farmacosenibilità attraverso la determinazione della MIC di un panel predefinito di antimicrobici, nei confronti di specie microbiche ritenute clinicamente rilevanti. Gli animali sono stati conferiti al laboratorio entro 6 ore dall'accasamento. Il campionamento è stato ripetuto al momento della macellazione dei gruppi attraverso il prelievo del pacchetto intestinale di 25 soggetti maschi per capannone (3,2±0,2 kg). Il materiale è stato immediatamente congelato utilizzando ghiaccio secco.

#### *Isolamento e identificazione batterica*

Da ciascun pacchetto intestinale dei soggetti conferiti all'inizio e alla fine del ciclo produttivo, sono stati effettuati accertamenti batteriologici finalizzati all'isolamento di *E. coli* ed *Enterococcus* spp. Per l'isolamento di *E. coli* è stato impiegato il terreno differenziale denominato eosin methylene blue agar (EMB) (Beckton Dickinson) mentre per l'isolamento dei ceppi di *Enterococcus* spp. è stato utilizzato il terreno non selettivo Agar Sangue (Bioline) addizionato con esculina (ASE). Entrambi i terreni sono stati incubati a 37 °C, in condizioni di aerobiosi e ispezionati dopo 24 ore. In caso di modesta crescita batterica, l'incubazione veniva protratta per ulteriori 24 ore alle medesime condizioni. Le colonie cresciute su EMB con morfologia riferibile a *E. coli* e quelle cresciute su ASE costituite da microrganismi in grado di idrolizzare l'esculina evidenziabile sotto lampada di Wood, venivano isolate e identificate mediante MALDI TOF MS (Bruker Daltonics).

Per ciascun gruppo analizzato, sono state collezionate fino a un massimo di 50 colonie di *E. coli* e 50 di *E. faecalis*, di cui 25 isolate all'inizio e 25 alla fine del ciclo produttivo. Tali ceppi sono stati conservati in condizioni di congelamento (-80 °C).

#### *Test di farmacosenibilità*

Il test di farmacosenibilità è stato condotto su un massimo di 10 ceppi di *E. coli* e 10 di *E. faecalis* isolati ciascuno da singolo pacchetto intestinale all'inizio e alla fine del ciclo produttivo.

La farmacosenibilità dei ceppi collezionati è stata saggiata attraverso microdiluizioni in brodo di un panel predefinito di antimicrobici, al fine di individuare la minima concentrazione inibente (MIC). Per i ceppi di *E. coli* è stato utilizzato un kit commerciale miniaturizzato allestito con 13 molecole (Thermo Scientific™ Sensititre™ NARMS Gram Negative Plate) mentre per *E. faecalis* è stato impiegato un kit commerciale contenente 16 antimicrobici (Thermo Scientific™ Sensititre™ Gram Positive MIC Plate). Colistina è stata saggiata separatamente attraverso il metodo di determinazione della MIC descritto nel manuale CLSI M07-A10 (2015).

#### *Analisi statistica*

I profili di farmacosenibilità dei ceppi di *E. coli* e di *Enterococcus faecalis* sono stati sintetizzati in termini di percentuale di resistenza, applicando breakpoints

clinici per l'uomo (CLSI, 2016). Al fine di valutare una eventuale differenza significativa nei livelli di resistenza fra inizio e fine ciclo, è stato adottato un modello logistico a effetti misti, inserendo il capannone come cluster. A scopo descrittivo, sono state inoltre riportate le medie geometriche e i relativi intervalli di confidenza al 95% dei valori di MIC per singolo principio attivo.

## RISULTATI

I profili di farmacosensibilità dei ceppi di *E. coli* sono riportati in Tab. 1, mentre quelli dei ceppi di *Enterococcus faecalis* sono riportati in Tab. 2. In tabella 3 sono riportati i trattamenti con antimicrobici effettuati nel corso dei cicli oggetto di studio e in quelli immediatamente precedenti. L'analisi statistica ha evidenziato variazioni significative nella distribuzione dei ceppi di *E. coli* resistenti a fine vs. inizio ciclo con una diminuzione nei confronti di Amoxicillina + ac. Clavulanico e Ciprofloxacina ( $P < 0,05$ ), ma un aumento nei confronti di Gentamicina ( $P < 0,05$ ), Ampicillina ( $P < 0,05$ ), Streptomina ( $P < 0,01$ ) e Trimetoprim-sulfametossazolo ( $P < 0,001$ ).

L'analisi statistica ha evidenziato variazioni significative nella distribuzione dei ceppi di *E. faecalis* resistenti a fine vs. inizio ciclo con un aumento nei confronti di Cloramfenicolo ( $P < 0,01$ ) e Tilosina ( $P < 0,05$ ).

**Tab. 1.** Valori di resistenza e medie geometriche di MIC di 120 ceppi di *E. coli* isolati a inizio e fine ciclo in 6 capannoni di polli da carne.

principio attivo	% resistenti (min-max)		Media geometrica MIC (IC 95%)	
	inizio	fine	inizio	fine
Cefoxitina	12% (0%-40%)	3% (0%-10%)	4,33 (3,58-5,24)	3,68 (3,15-4,31)
Azitromicina	0%	0%	3,56 (3,08-4,11)	2,86 (2,47-3,31)
Cloramfenicolo	38% (0%-80%)	25% (10%-60%)	10,68 (8,45-13,49)	8,19 (6,58-10,19)
Tetraciclina	63% (10%-100%)	57% (20%-80%)	14,59 (11,24-18,93)	13 (9,94-17)
Ceftriaxone	5% (0%-10%)	5% (0%-10%)	0,31 (0,24-0,41)	0,32 (0,24-0,43)
Amoxi.-ac. clavulanico	20% (10%-50%)	3% (0%-20%)	7,46 (6,47-8,61)	6,81 (6,09-7,61)
Ciprofloxacina	58% (30%-100%)	38% (10%-70%)	0,2 (0,11-0,38)	0,06 (0,03-0,09)
Gentamicina	3% (0%-10%)	20% (0%-50%)	0,8 (0,66-0,97)	1,26 (0,89-1,78)
Ac. Nalidixico	48% (10%-100%)	37% (0%-70%)	9,19 (6,5-13)	5,72 (4,02-8,14)
Ceftiofur	5% (0%-10%)	5% (0%-10%)	0,57 (0,47-0,7)	0,52 (0,44-0,63)
Sulfisossazolo	0%	0%	191,71 (159,89-229,86)	222,86 (193,18-257,11)
Trimetoprim-sulfametossazolo	23% (0%-70%)	77% (30%-100%)	0,28 (0,19-0,41)	1,81 (1,24-2,63)
Ampicillina	73% (20%-100%)	88% (60%-100%)	16 (11,79-21,72)	23,43 (18,71-29,33)
Streptomina	30% (10%-80%)	60% (30%-90%)	12,13 (9,22-15,95)	23,7 (17,73-31,67)
Colistina	2% (0%-10%)	0%	0,30 (0,28-0,32)	0,28 (0,26-0,30)

**Tab. 2.** Valori di resistenza e medie geometriche di MIC di 102 ceppi di *E. faecalis* isolati a inizio e fine ciclo in 6 capannoni di polli da carne.

principio attivo	% resistenti (min-max)		Media geometrica MIC (IC 95%)	
	inizio	fine	inizio	fine
Tigeciclina	0%	0%	0,12 (0,11-0,14)	0,12 (0,12-0,13)
Eritromicina	90% (70%-100%)	100%	3,95 (2,9-5,37)	7,21 (6,41-8,11)
Tetraciclina	92% (90%-100%)	98% (90%-100%)	24,38 (18,71-31,77)	30,2 (26,91-33,9)
Ciprofloxacina	59% (40%-80%)	48% (20%-70%)	1,50 (1,36-1,65)	1,41 (1,28-1,55)
Cloramfenicolo	4% (0%-10%)	35% (0%-80%)	7,79 (7,28-8,33)	12,7 (10,75-15,01)
Penicillina	0%	2% (0%-10%)	2,19 (2,05-2,35)	2,43 (2,19-2,7)
Daptomicina	0%	2% (0%-10%)	1,79 (1,58-2,03)	2,3 (2,02-2,62)
Vancomicina	2% (0%-10%)	2% (0%-10%)	1,59 (1,37-1,84)	1,15 (1,03-1,29)
Streptomicina	2% (0%-10%)	47% (0%-90%)	526,11 (498,15-555,63)	977,76 (816,55-1170,79)
Nitrofurantoina	0%	0%	14,15 (12,53-15,98)	9,96 (8,64-11,48)
Tilosina tartrato	69% (40%-90%)	95% (80%-100%)	13,41 (9,3-19,32)	27,86 (23,8-32,61)
Gentamicina	0%	23% (10%-50%)	128	205,55 (165,8-254,83)
Lincomicina	100%	100%	8	8
Linezolid		3% (0%-10%)	1,82 (1,7-1,95)	1,69 (1,45-1,97)
Kanamicina	2% (0%-10%)	43% (20%-70%)	-	-
Quinopristina-Dalfopristina	100%	100%	8,97 (7,60-10,18)	12,84 (11,38-14,50)

**Tab. 3.** Principi attivi utilizzati nel corso dei cicli analizzati e in quelli immediatamente precedenti

Ciclo	Incubatoio d'origine	Trattamenti ciclo	Trattamenti ciclo precedente
A1	X	amoxicillina	sulfadiazina-trimetoprim; amoxicillina
B1	X	amoxicillina	sulfadiazina-trimetoprim; amoxicillina
C1	X	amoxicillina	lincomicina-spectomicina; amminosidina
A2	Y	sulfadiazina-trimetoprim	sulfadiazina-trimetoprim
B2	Y	sulfadiazina-trimetoprim	sulfadiazina-trimetoprim
C2	X	sulfadiazina-trimetoprim	-

## DISCUSSIONE

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di indagare i livelli di AMR in batteri commensali indicatori (*E. coli*, *E. faecalis*) isolati da polli da carne all'inizio e alla fine di 6 cicli produttivi. I risultati indicano una notevole variabilità tra capannoni,

mentre è stata rilevata una relativa omogeneità tra ceppi isolati all'interno dello stesso gruppo di soggetti. Questo risultato, considerando le condizioni ambientali molto simili (capannoni di uno stesso allevamento) conferma quanto evidenziato in precedenti lavori riguardo la complessità dei meccanismi di trasferimento dei fattori di resistenza, in connessione con fattori ambientali e non sempre associabili in modo chiaro ai trattamenti effettuati.

I ceppi commensali che colonizzano l'intestino del pollo possono derivare dall'assunzione di flore batteriche dei riproduttori presenti sul guscio, oppure possono essere assunti dall'ambiente durante le successive fasi d'accrescimento. Le capacità di colonizzazione dei singoli ceppi non sono note, ma si sa che i trattamenti antimicrobici possono indubbiamente indurre una selezione dei ceppi che colonizzeranno l'intestino dell'ospite. A questo proposito si è osservato che un uso frequente di amoxicillina risultasse associato a un aumento dei livelli di resistenza per l'ampicillina (aminopenicillina della medesima classe farmacologica). Inoltre, un uso altrettanto frequente di sulfadiazina-trimetoprim risultava associato a un aumento dei livelli di resistenza dei ceppi verso una associazione della stessa classe farmacologica (Trimetoprim-sulfametoxazolo), che sono passati da 23% all'inizio del ciclo a 77% al termine.

Altra differenza significativa è stata registrata per entrambi gli aminoglicosidi testati nel presente studio (gentamicina e streptomina), a testimonianza di una resistenza crociata reale per tali molecole. Questa differenza nelle percentuali di resistenza non trova spiegazione nei trattamenti terapeutici dato che l'unico aminoglicoside impiegato (aminosidina) è stato somministrato solo in un ciclo produttivo. La vicinanza tra i valori della media geometrica delle MIC registrate all'inizio e alla fine del ciclo produttivo, suggerisce comunque una variazione sostanzialmente modesta dei valori di MIC. Non sono state osservate differenze significative dei profili di farmacoresistenza nei confronti di molecole ritenute criticamente importanti in terapia umana (CIA) quali cefalosporine di III e IV generazione, fluorchinoloni di II generazione e colistina.

In questo studio il dato convertito in termini di resistente/sensibile è stato accompagnato dai valori di medie geometriche di MIC per ciascun principio attivo. Questa scelta mette in evidenza la potenzialità di questa metodica di rendere più sensibile e graduata la valutazione della risposta agli antimicrobici, identificando scostamenti anche minimi rispetto alla media.

## **CONCLUSIONI**

Lo studio ha confermato la complessità dei fenomeni di resistenza, non sempre associabili in modo chiaro agli specifici trattamenti effettuati sugli animali. È stata tuttavia evidenziata la necessità di implementare a livello di filiera dei protocolli efficaci di contrasto dell'AMR in termini di sanificazione ambientale (strategia di non semplice realizzazione), ma soprattutto di gestione sanitaria dei riproduttori (fattibilità limitata dall'assenza delle linee gran parentali a livello nazionale) e a livello di incubatoio, in quanto per numerose molecole si è evidenziato un elevato livello di resistenza nei pulcini di un giorno, omogeneamente distribuito nel gruppo, che è poi risultato inferiore a fine ciclo. Quest'ultima osservazione suggerisce una maggiore attenzione nel cercare di diminuire le resistenze soprattutto nei gruppi gran-parentali e parentali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standard, tenth ed. CLSI document M07-A10, vol. 35, No. 2., Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2016). M100-S26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 26th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
3. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA BIOHAZ Panel (European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards) and CVMP (EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use). (2017). ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA Journal* 2017;15(10):5017, 70 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017>.
4. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(2):4036, 178 pp., doi:10.2903/j.efsa.2015.4036
5. Ministero della Salute. (2014). Relazione sulla resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali - anno 2014 - settore avicolo. Disponibile online: [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2476\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2476_allegato.pdf)
6. Ozaki H, Esaki H, Takemoto K, Ikeda A, Nakatani Y, Someya A, Hirayama, N, and T Murase. (2011). Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet. Microbiol.* 150: 132-139.
7. Simoneit C, Burow E, Tenhagen BA and A Käsbohrer. (2015). Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken—a systematic review. *Prev. Vet. Med.* 118: 1-7.
8. Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL and MD Lee. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 73:1404-1414.



## EFFICACIA DI RP03® PER IL CONTROLLO DELLE INFESTAZIONI DA *DERMANYSSUS GALLINAE* IN ALLEVAMENTI AVICOLI

Cocciolo G.<sup>1</sup>, Circella E.<sup>1</sup>, Giangaspero A.<sup>2</sup>, Bevilacqua A.<sup>2</sup>, Gradoni L.<sup>3</sup>, Previtera I.<sup>1</sup>, Camarda A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sezione di Patologia aviare, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”*

<sup>2</sup>*Departmento di Scienze Agrarie, Alimenti e Ambiente, Università di Foggia*

<sup>3</sup>*Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy*

### Summary

The Poultry Red Mite *Dermanyssus gallinae* is a major issue in laying hen flocks all over the world because of its effects on animals (stress, declining production), on the quality of eggs (spots of blood) and because of its economic impact for its control. Several drugs proved to be effective against the mite. However, the appearance of a resistance, the difficulty in finding products to be used during the production cycle, and the risk that residues could be retrieved in avian products (meat and eggs), led the scientific community to seek alternative and natural products, which might be efficient and safe.

Among these, Neem oil seems to be an excellent candidate for the use in field.

The purpose of this work was to verify the effectiveness of RP03®, a natural product Neem oil based, against *D. gallinae* in an intensive laying hen flock for the production of eggs for consumption. The study has been carried out in a shed, ranking a level 4 of infestation according the classification of Cox et al., (2009).

The formulation of Neem oil (RP03®), containing Azadirachtin 2400 p.p.m. was administered by nebulization three times in a week.

The population density before and after treatments was monitored by collecting the mites through corrugated cardboard traps placed inside a rigid plastic sheath, attached to the outside of the cages. Mites in the traps were inactivated by freezing and their number was estimated through the evaluation of their total weight.

The monitoring of the population of *D. gallinae* was extended to the row immediately adjacent to the one treated (buffer) and to the row on the opposite side (control).

The treatment with RP03® caused, in the treated row, the reduction in the mite population of 94.65%, 99.64% and 99.80% after the first, second and third administration, respectively, and of 99.54% at the end of the observation period after 162 days.

After the third treatment, a reduction of 82% and 83.7% was observed also in the control and buffer row, respectively. This was probably due to the dispersion of the product inside the shed, after the activation of the extractors used for air exchange.

In conclusion, the results of this study seem to demonstrate the effectiveness of RP03®-neem oil based solution in the control of *D. gallinae* in poultry flocks of laying hens in cages.

Thanks to the low level of toxicity of the active ingredient, and to the absence of residues in products of avian origin, it could be safely used for the control of poultry red mite in field. Further studies should be addressed to overcome some undesired effects observed on poultry equipment and eggs, such as the persistence of an oily film few days post treatment.

## INTRODUZIONE

*Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778), è considerato il più importante ectoparassita del pollame in Europa. Diffuso principalmente negli allevamenti di galline ovaiole, si stima possa raggiungere percentuali di infestazione anche del 90% (Sparagano et al. 2009). La sua presenza in allevamento provoca un gravissimo stress agli animali, grave anemia aumento della mortalità, e un impatto negativo sulla produzione delle uova (Kilpinen et al., 2005; Cosoroaba, 2001). Non è infine da sottovalutare il ruolo dell'acaro quale di potenziale vettore e serbatoio di malattie infettive (Valiente-Moro et al., 2009).

Il controllo del *Dermanyssus gallinae* è particolarmente complesso, e spesso affidato a molecole di sintesi quali carbamati, organofosforici e piretrine che non sempre raggiungono i risultati sperati. Il loro prolungato utilizzo, infatti, può portare ad una riduzione di efficacia imputabile spesso allo sviluppo di popolazioni di acari resistenti (Chauve 1998). Non va sottaciuto infine, il rischio che l'uso improprio di farmaci di sintesi possa portare all'introduzione sul mercato di prodotti alimentari contenenti residui di farmaci che potrebbero avere potenziali ripercussioni sulla salute dell'uomo (Marangi et al, 2012).

Ci si è pertanto orientati sempre di più verso la ricerca di strategie di controllo alternative (Marangi et al., 2009), più efficaci, che contemplino, tra le altre cose, anche l'impiego di molecole di origine naturale, in grado di coniugare efficacia e scarsa tossicità per animali ed uomo (George et al., 2008 a, b; Maurer et al., 2009).

Tra queste, soluzioni a base di olio di Neem hanno dimostrato una certa efficacia contro una vasta gamma di parassiti, insetti e artropodi ematofagi, (Alzohairy, 2016), L'estratto di Neem deve la sua efficacia a numerosi principi attivi, ed in particolare all'Azadiractina, che agisce principalmente bloccando l'ormone della crescita nei giovani insetti, interviene sulla riproduzione e interrompe la sintesi della chitina (Mordue and Nisbet, 2000).

Nonostante sia già in commercio un prodotto a base di olio di Neem (MiteStop<sup>R</sup>) le ricerche scientifiche riguardanti l'efficacia del Neem su *Dermanyssus gallinae* in campo sono molto scarse.

Si è inteso pertanto valutare in un allevamento di galline ovaiole l'efficacia di un prodotto a base di olio di Neem (RP03<sup>®</sup>) in un allevamento industriale di galline ovaiole caratterizzato alti livelli di infestazione da *Dermanyssus gallinae*.

## MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta tra settembre 2016 e febbraio 2017 in un allevamento industriale di galline ovaiole in gabbie arricchite situato in provincia di Brindisi, Puglia.

Il capannone in cui è stata eseguita la prova aveva una lunghezza di 75 metri ed una larghezza 12,5 metri. La ventilazione era forzata a pressione negativa, a regolazione elettronica. Il capannone, inoltre, era dotato di un impianto di condizionamento ad acqua del tipo pad-cooling.

In totale, i capi allevati erano 19.000, omogeneamente distribuiti in 4 file, ciascuna dotata di 2 lati e 4 piani. In ogni fila erano presenti 59 gabbie di 1,10 metri di lunghezza ciascuna. In ogni gabbia erano accasati 20 capi per un totale di 4750 ovaiole per ciascuna fila.

Gli animali erano alimentati *ad libitum* con un mangime commerciale.

Non sono stati effettuati trattamenti con acaricidi nei tre mesi precedenti alla sperimentazione. Quest'ultima è stata condotta secondo le linee guida universali sul benessere animale.

### **Trattamento con RP03®**

Per la prova è stato utilizzato RP03®, una soluzione contenente olio di Neem, diluito al 20% in acqua e coformulanti (concentrazione totale di Azadiractina 2400 p.p.m.) somministrato per spray.

In totale per ciascun trattamento sono stati utilizzati 150 Litri di soluzione, pari a 0,32 litri per m<sup>2</sup>.

Il trattamento è stato effettuato per tre volte a distanza di 3 giorni l'uno dall'altro (T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>7</sub>).

Durante il trattamento, al fine di consentire una omogenea solubilizzazione del prodotto la soluzione è stata mantenuta in agitazione permanente.

La sperimentazione è stata condotta su 3 delle 4 file di gabbie presenti nel capannone. In particolare la fila 1, quella più distante dalla fila trattata, è stata mantenuta come "controllo negativo", la fila 3, "buffer", adiacente alla fila trattata, è stata monitorata per verificare un eventuale effetto sugli acari dovuto alla dispersione dell'RP03® mentre la fila 4 è stata sottoposta al trattamento acaricida. La fila 2 non è stata né trattata né monitorata.

### **Monitoraggio**

Al momento in cui la sperimentazione è stata avviata, il livello d'infestazione stimato del capannone era pari a "IV" secondo la scala di Cox et al. (2009).

Prima di procedere al trattamento è stata effettuata una stima della popolazione di acari mediante posizionamento di trappole in cartone corrugato delle dimensioni di 100 x 140 mm e di 3 mm di spessore (Nordenfors et al., 1999). Il cartone veniva arrotolato ed inserito in una guaina di plastica rigida di pari lunghezza che era fissata all'esterno delle gabbie.

Al fine di ottenere una stima omogenea della popolazione presente in ciascuna fila, si è scelto di posizionare le trappole ad altezze differenti per ciascun lato. In totale, per ciascun lato sono state posizionate 20 trappole, 40 per ogni fila e 120 in totale per ogni ciclo di monitoraggio.

Le trappole venivano mantenute *in situ* per 72 ore prima di essere rimosse e poste in buste sigillate che sono state inviate al laboratorio per la lettura.

Per il monitoraggio della popolazione di acari le trappole sono state posizionate a T<sub>-4</sub>, T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>18</sub>, T<sub>27</sub>, T<sub>34</sub>, T<sub>41</sub>, T<sub>50</sub>, T<sub>59</sub>, T<sub>69</sub>, T<sub>87</sub> e T<sub>162</sub> dopo il primo trattamento.

Le trappole ritirate dai contenitori in plastica sono state poste in buste in plastica sterili singole, e quindi inviate in laboratorio. Qui sono state poste in congelatore e mantenute per 48 ore al fine di ottenere l'inattivazione degli acari.

La lettura è stata effettuata "in cieco". Gli acari sono stati posti in piastra Petri e identificati secondo le chiavi morfologiche di Moss (1968) e Di Palma et al. (2012). La conta è stata effettuata allo stereomicroscopio. Quando il numero di acari superava 500 la lettura è stata effettuata mediante pesatura. La calibrazione sulla quale effettuare il calcolo è stata eseguita valutando il peso di almeno 5 aliquote da 100 acari ciascuna.

### **Analisi statistica dei dati**

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A.) sui dati scaturiti dalle conte e trasformati in logaritmo.

La distribuzione della popolazione iniziale di *Dermanyssus* è stata valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk.

La riduzione della popolazione di acari nel tempo è stata analizzata mediante il test di distribuzione di Weibull, come riportato da Geeraerd et al, 2005.

### **RISULTATI**

Il livello di infestazione, calcolato prima del trattamento, ha consentito di stabilire che la popolazione media per trappola nelle tre file, era pari a  $48.284 \pm 15.864$ ,  $9.594 \pm 7.430$ , e  $3.049 \pm 4.689$  rispettivamente, nelle file controllo (1), buffer (3) e trattata (4).

A seguito del primo trattamento è stata osservata una riduzione media degli acari pari a 0,44, 0,40 e 1,27 Log rispettivamente nelle file controllo, buffer e trattata, mentre dopo il terzo trattamento il calo registrato rispetto al  $T_0$  era di 0,74, 0,78 e 2,71 Log, evidenziando, pertanto un maggiore e significativo abbattimento della popolazione di acari nella fila trattata rispetto alle altre due.

Dodici giorni dopo il primo trattamento, nella fila trattata e in quella di controllo si osservava un incremento medio rispettivamente di 0,30 e 0,22 Log rispetto al valore registrato otto giorni prima, significativo in entrambi i casi ( $P = 0,0385$  e  $P = 0,0007$ ), mentre nella fila buffer non si osservavano oscillazioni statisticamente significative. Tuttavia, va sottolineato che il numero complessivo di acari registrato a partire dalla fila trattata rimaneva molto basso ( $12 \pm 15$ ) rispetto a quello della fila di controllo ( $14,388 \pm 8,234$ ).

Al giorno 59 della sperimentazione, 53 dall'ultimo trattamento, il numero di acari rilevato nella fila trattata rimaneva molto basso ( $5 \pm 4$ ), contro i  $188 \pm 207$  e  $2.643 \pm 2.529$  delle fila buffer e controllo.

Considerando gli ultimi due punti di controllo, relativi al giorno 69 e al giorno 162 dall'inizio della sperimentazione (63 e 152 dall'ultimo trattamento), si registrava un aumento del numero medio degli acari in tutte e tre le file. Nella fila trattata, al giorno 162 l'aumento medio era di 0,26 Log rispetto al giorno 59 con una significatività statistica di  $P = 0,049$ , che portava il numero medio di acari per trappola a  $9 \pm 12$ . L'incremento medio è stato molto più marcato nella fila buffer (1,22 Log) e statisticamente significativo ( $P = 0,0006$ ), e lo stesso è stato osservato per la fila di controllo (0,52 Log;  $P < 0,0001$ ). Dopo 162 giorni, gli acari nella fila trattata erano circa 1000 volte meno rispetto alla fila di controllo, e circa 200 volte meno rispetto alla fila buffer.

### **DISCUSSIONE**

Il trial condotto dimostra la capacità di RP03® di abbattere la popolazione di *Dermanyssus gallinae* quando somministrato per via spray in un allevamento di galline ovaiole.

Nella sperimentazione descritta si è inoltre ottenuta una riduzione significativa della consistenza della popolazione di acari che si è protratta per l'intero periodo di osservazione.

Al momento del trattamento vi era nel capannone una distribuzione di acari disomogenea nelle diverse file. Infatti, il numero medio di acari nelle trappole della fila 1 e 3 era superiore a quella della fila 4 rispettivamente di oltre 10 e 3 volte.

I motivi che hanno potuto portare a tale situazione, già nota nella pratica di campo, sono vari e non sempre facilmente individuabili. Ad esempio, le condizioni microclimatiche (temperatura, umidità, concentrazione di alcuni gas) del capannone possono aver favorito in alcuni punti una maggiore o minore proliferazione degli acari (Maurer and Baumgärtner, 1992; Koziatek and Sokol, 2015; Nordenfors et al., 1999; Nordenfors and Hoglund, 2000). Tuttavia, la normalizzazione dei dati, effettuata per sottoporre ad analisi statistica i risultati, ha consentito valutazioni oggettive circa l'efficacia mostrata da RP03® nei confronti del *Dermanyssus gallinae*. Già dopo il primo trattamento, è stato osservato nella popolazione trattata, un calo del numero medio degli acari ben superiore al 90%. Il calo è superiore al 99% nella fila trattata dopo il secondo ed il terzo trattamento. L'efficacia dell'azione acaricida si è infine mantenuta per l'intero periodo di osservazione. Questo risultato, notevolmente superiore a quello della fila controllo e buffer potrebbe essere ascrivibile al meccanismo di azione dell'Azadiractina che esplicherebbe la sua attività acaricida non solo sugli adulti ma anche su stadi intermedi e larve (Abdel-Ghaffar et al., 2008).

La riduzione della popolazione di acari si è estesa anche alla file buffer e controllo. Tale riduzione potrebbe essere imputata ad una dispersione dell'RP03® nel capannone favorita dall'attivazione dell'impianto di ventilazione.

Nella fila buffer la popolazione ha continuato a calare fino alla fine del periodo di osservazione, mentre nella fila controllo si è assistito ad una ripresa dello sviluppo nel numero degli acari.

È possibile che il calo continuo del numero di acari nella fila buffer fosse da attribuire ad un'attività residuale del prodotto utilizzato, verificatosi a causa della vicinanza con la fila trattata.

Il trattamento non ha determinato negli animali la comparsa di alcuna sintomatologia clinica e l'allevatore non ha mai segnalato alcun impatto negativo sulla deposizione o sulla qualità delle uova per l'intero periodo di osservazione.

Unico inconveniente da segnalare è stata la formazione di un film oleoso su strutture (gabbie, nastro trasportatore delle uova) e pavimento che si è mantenuto per alcuni giorni. Nelle prime 24 ore dopo il trattamento, inoltre, si segnala l'imbrattamento di alcune uova con la soluzione di RP03® raccoltasi in eccesso in alcuni punti del nastro convogliatore che, però si è risolto nel giro di 24/36 ore. Nel capannone, infine, l'allevatore ha segnalato per alcuni giorni dopo il trattamento, la persistenza di un odore caratteristico che però non sembra essersi trasferito alle uova.

## CONCLUSIONI

Questo studio dimostra l'efficacia di RP03® nei confronti di *Dermanyssus gallinae*. L'impiego di molecole di origine naturale come strumento per il trattamento delle infestazioni indotte da questi acari sarebbe auspicabile, ed è fortemente richiesto dal mercato, preoccupato dalle notizie di stampa che riportano della presenza di residui di molecole proibite nelle uova e nei prodotti da esse derivati. Ulteriori trial di campo sono necessari per superare gli inconvenienti riscontrati durante la sperimentazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Ghaffar F, Sobhy HM, Al-Quraishy S, Semmler M. (2008). Field study on the efficacy of an extract of neem seed (Mite-Stop®) against the red mite *Dermanyssus gallinae* naturally infecting poultry in Egypt. *Parasitol Res.* 103:481–485.
2. Alzohairy MA. (2016). Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016 1; 2016:7382506.
3. Chauve C. (1998). The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Veterinary Parasitology* 79: 239-245.
4. Cosoroaba I. (2001). Massive *Dermanyssus gallinae* (De Geer 1778) invasion in battery-husbandry raised fowls in Romania [egg-laying decrease, mortality]. *Rev.Med.Vet.* (France).
5. Cox M, De Baere K, Vervae E, Zoons J, Fiks-Van Niekerk T. (2009). Red mites: monitoring method and treatment. In: *Book of Abstracts 8th European symposium on poultry welfare*, Cervia, Italy, 18–22 May, p 8.
6. Di Palma A., Giangaspero A. Cafiero M.A., & Germinara G.S. (2012). A gallery of the key characters to ease identification of *Dermanyssus Gallinae* (Acari: Gamasida: Dermanyssidae) and allow differentiation from *Ornithonyssus sylviarum* ( Acari: Gamasida: Macronyssidae). *Parasites and vector*, 5, 104.
7. Geeraerd A.H., Valdramidis, VP and van Ompe JF. (2005) GInaFIT, a freeware tool to asses non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of food Microbiology.* 102, 95-105.
8. George D, Calaghan K, Guy JH, Sparagano OAE. (2008a). Lack of prolonged activity of lavender essential oils as acaricides against the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) under laboratory conditions. *Research in Veterinary Science* 85(3): 540-542.
9. George DR, Smith TJ, Sparagano OAE, Guy JH. (2008b). The influence of ‘time since last blood meal’ on the toxicity of essential oils to the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Veterinary Parasitology* 155: 333-335.
10. Kilpinen O, Roepstorff A, Permin A, Norgaard-Nielsen G, Lawson LG, Simonsen HB. (2005). Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*).
11. Koziatek S, Sokół R. (2015). *Dermanyssus gallinae* still poses a serious threat for the rearing of laying hens. *Polish Journal Of Natural Sciences Abbrev.* Pol. J. Natur. Sc. 30(4): 451–463.
12. Marangi M, de Luna CJ, Cafiero MA, Camarda A, le Bouquin S, Huonnic D, Giangaspero A, Sparagano OA. (2009). Phylogenetic relationship between *Dermanyssus gallinae* populations in European countries based on mitochondrial COI gene sequences. *Exp Appl Acarol.* 48(1-2):143-55.
13. Marangi M, Morelli V., Pati S., Camarda A., Cafiero M.A. & Giangaspero A., (2012). Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. *Plos One*, 7, e31795.
14. Maurer V, Baumgartner J. (1992). Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Experimental & Applied Acarology* 15: 27-40.

15. Maurer V, Perler E, Heckendorn F. (2009). In vitro efficacies of oils, silicas and plant preparations against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology* 48: 31- 41.
16. Mordue (Luntz) AJ, Nisbet AJ. (2000). Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Bras.* vol.29 no.4 Londrina.
17. Moss WW (1968). An illustrated key to the species of the acarine genus *Dermanyssus* (Mesostigmatas: Laelapoidea: Dermanyssidae). *Journal of medical entomology*, 5, 67-84.
18. Nordenfors H, Hoglund J, UgglA A. (1999). Effects of temperature and humidity on oviposition, molting and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Journal of Medical Entomology* 36: 68-72.
19. Nordenfors H, Hoglund J. (2000). Long term dynamics of *Dermanyssus gallinae* in relation to mite control measures in aviary systems for layers. *British Poultry Science* 41: 533-540.
20. Sparagano O., Pavličević A., Murano T., Camarda A., Sahibi H, Kilpinen O., Mul M., van Emous R., le Bouquin S., Hoel K., Cafiero M.A. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Experimental and Applied Acarology* Volume 48, Issue 1-2, pp 3-10.
21. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OA, Zenner L. (2009). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp Appl Acarol.* 48: 93-104.



# PICCOLI CAMBIAMENTI, GRANDI BENEFICI: INDAGINE DELL'EFFETTO DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA E DEL METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN GRECIA

Franzo G.<sup>1</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Andreopoulou M.<sup>2</sup>, Prentza Z.<sup>3</sup>, Koutoulis K.C.<sup>3</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Chaligiannis I.<sup>4</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Animal Medicine, Production and Health (MAPS), University of Padua, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

<sup>2</sup> *Centre of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, An den Tierkliniken 35, 04103, Leipzig, Germany*

<sup>3</sup> *Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Thessaly, Trikalon 224, 43100, Karditsa, Greece.*

<sup>4</sup> *Directorate of Veterinary Center of Thessaloniki, Ministry of Rural Development and Food, 26th October Street 80, 54627, Thessaloniki, Greece.*

## Summary

Respiratory diseases like *Infectious bronchitis virus* (IBV) and *Avian metapneumovirus* (aMPV) have been traditionally held accountable for major losses for poultry production. Nevertheless, scarce information was present dealing with the prevalence and molecular epidemiology of these infections in Greece and the efficacy of currently applied control strategies. To fill this gap, a specific epidemiological study was designed. Both IBV and aMPV field strain prevalence was proven high, approximately 20 and 30% respectively, being the GI-19 lineage and subtype B the most commonly detected IBV and aMPV genetic types, respectively. Infection with IBV field strains was significantly associated with clinical signs presence (odds ratio= **8.55**). Remarkably, only the vaccination protocol involving a double vaccination at 1 day of age was proven protective against IBV-induced symptomatology, with the **odds of developing disease being 4.14 times lower**.

No association was demonstrated between aMPV infection and clinical outbreaks or between aMPV and IBV detection, suggesting the marginal role of the former pathogen in poultry farming.

Globally, the present study provides the first detailed investigation of the epidemiological scenario of two viruses traditionally considered of pivotal relevance in poultry farming and demonstrates that remarkable benefits could be obtained just with minor adjustments of the vaccination protocols.

## INTRODUZIONE

Dal 2009, la Grecia ha conosciuto una rilevante crisi economica, che ha portato ad una diminuzione del prodotto interno lordo di circa il 40% nei successivi 7 anni. Anche l'accesso ai beni primari, quali il cibo, è stato condizionato negativamente da questa congiuntura, esitando in una diminuzione significativa del consumo di proteine di origine animale (<http://www.fao.org/faostat/>). Tradizionalmente, il pollame e le uova sono considerate fonti di proteine relativamente economiche e di alto valore biologico. Sebbene la produzione avicola in Grecia sia rimasta sostanzialmente costante nel tempo, i prezzi di produzione sono aumentati del 25% circa

fra il 2009 e il 2014, con ovvie conseguenze sul prezzo al consumatore e sulle abitudini alimentari (<http://www.fao.org/faostat/>). A questo fatto si è prevedibilmente accompagnato il fallimento o accorpamento di molte aziende del settore. Una moltitudine di fattori hanno contribuito alla genesi di questo scenario, inclusa la netta diminuzione degli investimenti in agricoltura, diminuiti da 3856 milioni di Euro nel 2008 a 1412 nel 2012. Sulla base di queste premesse, un ammodernamento del settore, mirato ad una riduzione dei costi di produzione, appare improbabile nel breve-medio periodo. Tuttavia, il perfezionamento della gestione dell'allevamento potrebbe senza dubbio portare a un immediato e significativo miglioramento per la avicoltura e, di riflesso, per la popolazione greca.

Le patologie respiratorie hanno una grande rilevanza economica nell'allevamento avicolo sia a cause delle perdite dirette da esse indotte, sia per i costi associati al loro controllo.

Fra queste, la Bronchite infettiva (BI) si è affermata come una delle patologie più diffuse e dannose, quantomeno in Europa (13). Similmente ad altri virus a singolo filamento di RNA, il virus della bronchite infettiva (IBV) presenta un elevato tasso di mutazione e di ricombinazione. Ciò ha portato all'emergere di diversi genotipi nel corso del tempo (23). In aggiunta, la vasta rete di connessioni internazionali ha favorito la diffusione di questo patogeno, rendendo probabile l'importazione di ceppi con differenti caratteristiche immunologiche (8). Questa grande variabilità genetica e antigenica, a cui si associa una scarsa cross-protezione, ha chiaramente complicato la messa a punto di strategie di controllo, ad oggi fondate principalmente sulla vaccinazione (25). Oltre all'uso di vaccini basati sul ceppo di campo circolante (vaccinazione omologa), molto comune è l'applicazione di una combinazione di vaccini basati su genotipi differenti (vaccinazione eterologa) al fine di aumentare lo spettro di protezione (5). Tuttavia, non può non essere sottolineato come diversi fattori manageriali, quali via di somministrazione, dose, tempistiche e condizioni di accasamento, possano sostanzialmente condizionare l'efficacia della vaccinazione (26). Nonostante questi limiti, quando effettuata in modo adeguato, la vaccinazione si è dimostrata in grado di limitare l'insorgenza di segni clinici e la circolazione virale (10,19). Appare quindi evidente la rilevanza di una dettagliata e aggiornata conoscenza dello scenario epidemiologico locale, al fine di poter calibrare al meglio gli interventi vaccinali, massimizzandone l'efficacia e il rapporto costo-beneficio. Purtroppo, queste informazioni sono mancanti in molti Stati, Grecia inclusa. Le scarse conoscenze epidemiologiche hanno sovente portato ad una scelta dei protocolli vaccinali basata su opinioni personali e consuetudini, piuttosto che su un'oggettiva analisi della realtà.

Sulla base di queste premesse, il presente studio mira ad ottenere una rappresentazione significativa dell'epidemiologia di IBV in Grecia, monitorando nel contempo l'efficacia delle strategie di controllo attualmente impiegate.

Recentemente, alcuni studi hanno evidenziato un potenziale incremento del ruolo di *Avian metapneumovirus* (aMPV) quale agente primario responsabile di episodi di sintomatologia respiratoria nel broiler (22). Sebbene questo patogeno sia stato precedentemente segnalato in Grecia (20), non sono attualmente disponibili informazioni precise sulla sua distribuzione e rilevanza clinica. Conseguentemente, la prevalenza e l'impatto di aMPV sono stati altresì valutati.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Sulla base dell'obiettivo primario dello studio, un minimo di 100 allevamenti doveva essere incluso al fine di stimare la prevalenza di allevamenti positivi per IBV in Grecia con una confidenza del 95% e una precisione del  $\pm 10\%$ , assumendo una prevalenza attesa del 50%. Il campionamento è stato stratificato sulla base del numero di allevamenti presenti nelle tre principali regioni produttive Greche: Epiro (Nord-ovest), Macedonia centrale e Grecia centrale. Si è inoltre cercato di ottenere un campione bilanciato fra allevamenti rurali e intensivi e fra broiler e ovaiole, sulla base delle rispettive frequenze. Da ciascuno degli allevamenti, selezionati in modo casuale, sono stati effettuati 10 tamponi tracheali, successivamente analizzati in un unico pool. Quando disponibili, per ciascun campione sono state raccolte le seguenti informazioni: data di campionamento, geolocalizzazione dell'allevamento, tipologia di allevamento (rurale o intensivo), categoria produttiva (ovaiole o broiler), età degli animali, dimensioni della popolazione, protocollo vaccinale utilizzato nei confronti di IBV e aMPV e, se presenti, tipologia di segni clinici.

### *Diagnosi di IBV e aMPV*

I pool di tamponi sono stati eluiti in 2 mL di PBS. 200 $\mu$ L della soluzione ottenuta sono stati estratti utilizzando il kit High Pure Viral RNA kit (Roche) seguendo le istruzioni del produttore. La diagnosi di IBV è stata effettuata tramite RT-PCR utilizzando i primer XCE-1 e XCE-2 e la metodica descritta da Cavanagh et al. (1999) (2) e gli amplificati ottenuti sono stati sequenziati utilizzando le medesime coppie di primer. La diagnosi e sub-tipizzazione di aMPV è stata effettuata utilizzando la real-time RT-PCR descritta da Franzo et al. (2014) (7). Parte del gene G è stata amplificata a partire dai campioni positivi utilizzando i primer Gstart+ e G6-, secondo il protocollo descritto da Cecchinato et al. (2010) (3), e successivamente sequenziata.

### *Analisi filogenetica*

La genotipizzazione dei ceppi di IBV è stata eseguita comparando le sequenze ottenute con il dataset di riferimento proposto da Valastro et al. (2016) (23). Brevemente, le sequenze sono state allineate utilizzando il programma MAFFT (18) e eventuali ceppi ricombinati sono stati identificati e rimossi utilizzando il software RDP4 (14). L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando il metodo di Maximum Likelihood implementato in PhyML (12). Un approccio comparabile è stato utilizzato per l'analisi filogenetica dei ceppi di aMPV.

### *Analisi statistica*

È stata valutata l'associazione statistica fra la positività a IBV/aMPV e protocolli vaccinali, tipologia produttiva, categoria animale, densità di popolazione, età e presenza di segni clinici. Per permettere una più robusta analisi statistica, i dati sono stati aggregati in un limitato numero di categorie. Più nel dettaglio, le differenti strategie vaccinali sono state riassunte in: "Vaccinazione: Sì/No" e ulteriormente caratterizzate in "Assenza di vaccinazione/ Vaccinazione combinata a 1 gg di vita/ Altri protocolli vaccinali". Similmente i segni clinici sono stati categorizzati come "Presenti/Assenti" e "Assenti/Respiratori/Enterici/Riproduttivi/Altro". Un'ulteriore variabile è stata introdotta per differenziare i ceppi IBV di origine vaccinale e di campo. I ceppi parte

del medesimo cluster e con una percentuale di identità nucleotidica superiore al 99% rispetto ai vaccini impiegati, sono stati classificati come ceppi vaccinali e i restanti come ceppi di campo.

La presenza di differenze statisticamente significative fra gruppi è stata valutata usando il test Chi-quadrato o il test esatto di Fisher nel caso di variabili categoriche, mentre nel caso di variabili continue sono stati utilizzati il t-test di Student o il test di Mann-Whitney. Qualora il confronto interessasse più di due gruppi, si è impiegato il test ANOVA o Kruskal-Wallis, seguiti da test post hoc (t-test o Mann-Whitney) con aggiustamento di Bonferroni per confronti multipli.

Quando appropriato, sono state effettuate delle regressioni logistiche per valutare e quantificare la rilevanza di diverse variabili nell'emergere di segni clinici, calcolando il relativo odds ratio. Il livello di significatività statistico è stato definito a  $p < 0.05$ .

La prevalenza di allevamento e il relativo intervallo di confidenza al 95% è stata calcolato sulla base del metodo asintotico di Wald utilizzando il pacchetto *prevalence* (6) di R. Una stima della prevalenza individuale e il relativo intervallo di confidenza al 95% è stata altresì ottenuta a partire dai risultati dei pool tramite una simulazione Markov Chain Monte Carlo, utilizzando l'approccio Bayesiano implementato nel medesimo pacchetto. A tal fine, una distribuzione uniforme fra 80 e 100% è stata assunta per i valori di sensibilità e specificità del test *a priori*. I valori *a priori* della prevalenza reale sono stati rappresentati da una distribuzione Beta (1,1).

## RISULTATI

### *Background*

Cento e sei allevamenti, 10 rurali e 96 commerciali, sono stati campionati nel periodo Marzo 2016 - Maggio 2017; in 78 allevamenti erano allevati broiler, mentre in 28 ovaiole. La distribuzione geografica degli allevamenti considerati è riportata in Figura 1. La vaccinazione nei confronti di IBV era applicata in 72 allevamenti mentre solamente 5 erano vaccinati per aMPV. Il protocollo vaccinale più comunemente implementato prevedeva una combinazione di Mass (ceppo H120) e 793B (ceppo 1/96). Un minor numero di allevamenti era stato vaccinato solamente con Mass (n=10) o con Mass in combinazione con vaccini basati su ceppi 4/91 (n=4) o QX (n=3).

In 33 allevamenti sono stati osservati i seguenti segni clinici: sintomi respiratori (n=17), riproduttivi (n=2), enterici (n=2) o altri (n=12). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative fra allevamenti commerciali e rurali nella presenza di segni clinici.

### *Epidemiologia di IBV*

Ottantanove allevamenti su 106 sono risultati positivi per IBV, corrispondente a una prevalenza di allevamento = 83.96% [95CI=76.98%-90.95%], mentre la prevalenza individuale stimata è risultata essere del 13% [95HPD 7.7%-19.7%]. Il sequenziamento e l'analisi filogenetica (Figura 2) hanno permesso di dimostrare la circolazione di 4 genotipi caratterizzati da una diversa prevalenza: 69 (65.09%) ceppi 793B, 14 (13.20%) QX, 4 (3.77%) Mass e 1 (0.94%) Ark. Tutti i ceppi Ark e Mass sono stati classificati come ceppi vaccinali, similmente a 65 dei 69 ceppi 793B (i.e. 53 1/96 e 12 4/91). Tutti i ceppi QX sono risultati ceppi di campo. In aggiunta, un ceppo derivante dalla ricombinazione dei genotipi QX e 793B è stato identificato.

Conseguentemente, un totale di 19 ceppi (14 QX, 4 793B e 1 ricombinate) sono sta-

ti classificati ceppi di campo, corrispondenti ad una prevalenza di allevamento del 17.97% [95CI 10.62%-25.22%] e individuale del 1.90% [95HPD 0.10%-4.30%]. Segni clinici sono stati osservati in 12 su 34 allevamenti non vaccinati e in 21 su 72 fra quelli vaccinati. Le differenze rilevate non sono tuttavia risultate statisticamente significative. Similmente, non è stata riscontrata alcuna differenza nella frequenza di ceppi di campo riscontrata in allevamenti vaccinati e non. Per valutare l'effetto delle differenti strategie vaccinali, oltre all'assenza di vaccinazione, sono state introdotte due nuove categorie rappresentative di allevamenti, dove una doppia vaccinazione eterologa è stata somministrata a 1gg di vita e di quelli sottoposti ad altre strategie vaccinali. In questo caso l'odds di sviluppare malattia è risultato 4.14 [95CI 1.34-14.51, p-value=0.017] volte più basso in animali sottoposti ad una vaccinazione combinata ad un giorno di vita. Al contrario, non sono state riscontrate differenze fra gli animali non vaccinati e quelli vaccinati con altri protocolli vaccinali (p-value= 0.12). La presenza di segni clinici è risultata significativamente più alta (odds 8.55 [95CI 2.17-24.90]) in allevamenti dove è stata provata la presenza di ceppi di campo. Altre associazioni fra positività a IBV e altri parametri di interesse (età degli animali, localizzazione geografica, stagione, etc.) non sono state riscontrate.

#### *Epidemiologia di aMPV*

Trentadue allevamenti sono risultati positivi a aMPV sottotipo B, corrispondente a una prevalenza di allevamento del 30.18% [95CI 21.45%-38.92%] e individuale del 2.8% (95HPD 0.1%-6%). Tutti i ceppi facevano parte del medesimo cluster filogenetico, che include altresì ceppi italiani e rumeni. Le uniche eccezioni erano rappresentate da due ceppi di aMPV che clusterizzavano con i vaccini NEMOVAC®(Merial) e Nobilis Rhino CV®(MSD), nonostante nessuno dei due allevamenti in esame fosse stato vaccinato nei confronti di aMPV.

La presenza di segni clinici è stata evidenziata in 10 allevamenti infetti su 32 (31,25%), similmente a quanto evidenziato in quelli non infetti (23 su 74; 31.08%). Conseguentemente, nessuna associazione è stata riscontrata fra aMPV e la presenza di sintomatologia. Risultati analoghi sono stati riscontrati considerando solamente la presenza di sintomatologia respiratoria. Nessuna associazione è stata riscontrata fra l'infezione con aMPV e IBV.

## **DISCUSSIONE**

IBV rappresenta una delle principali minacce per l'allevamento intensivo del pollame, causando perdite dirette a causa di mortalità, ridotto accrescimento e diminuzione nella produzione e qualità delle uova (1). In aggiunta, l'aumentata suscettibilità a infezioni secondarie richiede tipicamente degli interventi addizionali che, oltre a pesare negativamente sul bilancio aziendale, sono spesso scoraggiati dalle attuali politiche della comunità europea (e.g. riduzione dell'utilizzo di antimicrobici).

Il presente studio dimostra l'elevata prevalenza di IBV, sebbene la maggior parte degli stipiti identificati risulti di origine vaccinale. Tali risultati non devono sorprendere, considerato l'ampio utilizzo di vaccini vivi attenuati e la capacità di questi di persistere e circolare all'interno degli allevamenti (2,21). La presenza di ceppi vaccinali è tuttavia stata riscontrata anche in allevamenti non vaccinati o vaccinati con differenti protocolli vaccinali, confermando la capacità di questi virus di diffondere a livello locale e influenzare lo scenario epidemiologico, complicandone l'interpretazione (9). Ancor

più rilevante è il riscontro, in un allevamento non vaccinato, di un virus ricombinante i cui stipiti parentali sono risultati riconducibili a ceppi vaccinali QX e 793B. Il diffuso uso della vaccinazione può chiaramente creare condizioni favorevoli per l'instaurarsi di co-infezioni e quindi di ricombinazione. Sebbene questo fenomeno non possa essere sottovalutato, essendo stato frequentemente riscontrato da altri autori (13) ed essendo potenzialmente in grado di portare alla genesi di ceppi caratterizzati da un'elevata fitness (17), il caso qui considerato è risultato un riscontro occasionale ed è quindi probabile che lo stipite ricombinante identificato rappresenti una variante transitoria, caratterizzata da un limitato successo epidemiologico.

Il costo economico associato alla vaccinazione per IBV suggerisce che questa debba essere effettuata solo quando necessaria, ossia qualora: 1) il patogeno sia effettivamente circolante e responsabile di patologia; 2) le vaccinazioni applicate si dimostrino efficaci nel controllo della malattia.

Il presente studio dimostra la diffusa circolazione di ceppi di campo IBV in Grecia, in particolar modo appartenenti al genotipo QX. Questi ceppi sono stati più frequentemente riscontrati in presenza di segni clinici rispetto a quanto prevedibile per il solo effetto del caso, confermandone l'effettivo ruolo come agente primario di malattia. Tuttavia, ad una prima analisi, nessuna differenza significativa è stata riscontrata fra allevamenti vaccinati e non. Questi dati sono risultati assai sorprendenti, in quanto la maggior parte degli allevamenti in Grecia utilizzavano un protocollo di vaccinazione basato sul concetto di "protettotipo" (5), già dimostratosi efficace nel controllo della sintomatologia clinica sia in condizioni di campo che sperimentali (10,11,19). Conseguentemente, altre variabili possono aver influenzato negativamente l'efficacia della vaccinazione. È interessante notare come gli allevamenti dove entrambi i vaccini sono stati somministrati ad un giorno di vita presentassero un odds 4 volte inferiore di sviluppare segni clinici rispetto ad allevamenti non vaccinati. Al contrario, altre strategie vaccinali non sembrano fornire alcun vantaggio e, al contrario, sono state associate ad un odds 2.26 volte superiore di sviluppare malattia rispetto all'assenza di vaccinazione, sebbene tale differenza non sia risultata statisticamente significativa. Tale riscontro potrebbe essere attribuibile a fenomeni di reversione a virulenza o a un maggior danno all'epitelio respiratorio causato dalla replicazione vaccinale, potenzialmente più marcati a causa del minor *coverage* vaccinale e della conseguente prolungata ri-circolazione virale (4,16).

Una vaccinazione combinata potrebbe quindi essere più efficace nel contrastare l'emergere di sintomatologia clinica e i relativi danni, pur non prevenendo la circolazione dei ceppi di campo.

Questi risultati sono in conflitto con l'opinione generale che ritiene vantaggioso un ritardo nella seconda somministrazione vaccinale in quanto questa permetterebbe un recupero della funzionalità epiteliale e garantirebbe un effetto *booster* (15,24). Sebbene ulteriori studi siano necessari per investigare le cause di questo fenomeno, è possibile ipotizzare che la vaccinazione combinata in incubatoio garantisca un maggior *coverage* e miglior controllo sulle condizioni di somministrazione, compensando e superando i vantaggi immunologici e di replicazione attesi nel caso di interventi vaccinali separati. Sulla base di queste evidenze, un miglioramento nel controllo di IBV appare raggiungibile in Grecia semplicemente agendo su un uso più coscienzioso e mirato dei protocolli vaccinali già implementati, senza dover ricorrere a costosi interventi strutturali o a nuove strategie di controllo.

L'analisi dell'epidemiologia di aMPV ha fornito risultati altrettanto interessanti, dimostrando l'elevata prevalenza di questo virus in Grecia, evidenza già riscontrata in Italia. Tuttavia, alcune marcate differenze sono presenti fra i 2 Paesi. Similmente a quanto riportato in Italia (22), circa il 30% degli allevamenti infetti presentavano segni clinici. Tuttavia, in questo caso, il disegno dello studio ha permesso di evidenziare l'assenza di associazione statistica fra l'infezione con aMPV e la presenza di sintomatologia, supportando un ruolo marginale di questo patogeno, quantomeno in Grecia. Infatti, la presenza di aMPV con una frequenza del tutto comparabile in allevamenti sani e sintomatologici suggerisce che la sua identificazione sia probabilmente un riscontro incidentale in presenza di altri agenti eziologici primari.

La co-infezione fra aMPV e IBV è risultata comune; in particolare, il 68% e 28% dei campioni aMPV positivi si è rilevato positivo a ceppi di IBV vaccinali e di campo, rispettivamente. Anche in questo caso, lo scenario descritto è in netto contrasto con quello Italiano, ove solo il 4% dei campioni testati era risultato co-infetto con ceppi di campo. Tuttavia, nessuna interazione statisticamente significativa è stata riscontrata fra IBV e aMPV in termini di frequenza dell'infezione o di emergenza di segni clinici. Vari elementi potrebbero essere adottati per spiegare questi risultati. Deve innanzitutto essere sottolineato come IBV sia attualmente efficacemente controllata in Italia, evidenza che può facilmente giustificare la minor frequenza di co-infezioni. Appare inoltre possibile speculare come l'efficace vaccinazione per IBV possa aver alterato l'equilibrio competitivo fra questi patogeni, a beneficio di aMPV (22). Tuttavia, la mancanza di interazione fra IBV e aMPV qui dimostrata, sembra sconsigliare questa ipotesi. Un'ulteriore e suggestiva ipotesi è la presenza di diverse linee genetiche animali nei 2 Stati, caratterizzate da una variabile suscettibilità a aMPV. Più probabilmente, la combinazione di diversi elementi, comprendenti peculiarità degli stipiti virali, caratteristiche biologiche dell'ospite, fattori manageriali e il disegno sperimentale dello studio, possono aver determinato le differenze osservate.

## **CONCLUSIONI**

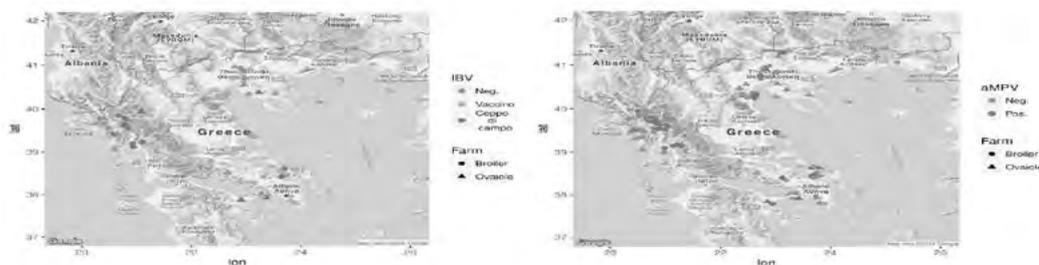
Il presente studio fornisce una solida e aggiornata descrizione dell'epidemiologia di IBV e aMPV in Grecia. Lo studio della prevalenza, distribuzione e caratteristiche molecolari di questi patogeni, assieme alla valutazione dell'efficacia delle strategie di controllo attualmente applicate, potranno essere utilizzate per guidare la messa a punto di adeguate politiche sanitarie, permettendo di indirizzare e ottimizzare i futuri investimenti e minimizzare i costi, non solo in Grecia ma anche su una scala più ampia.

## **BIBLIOGRAFIA**

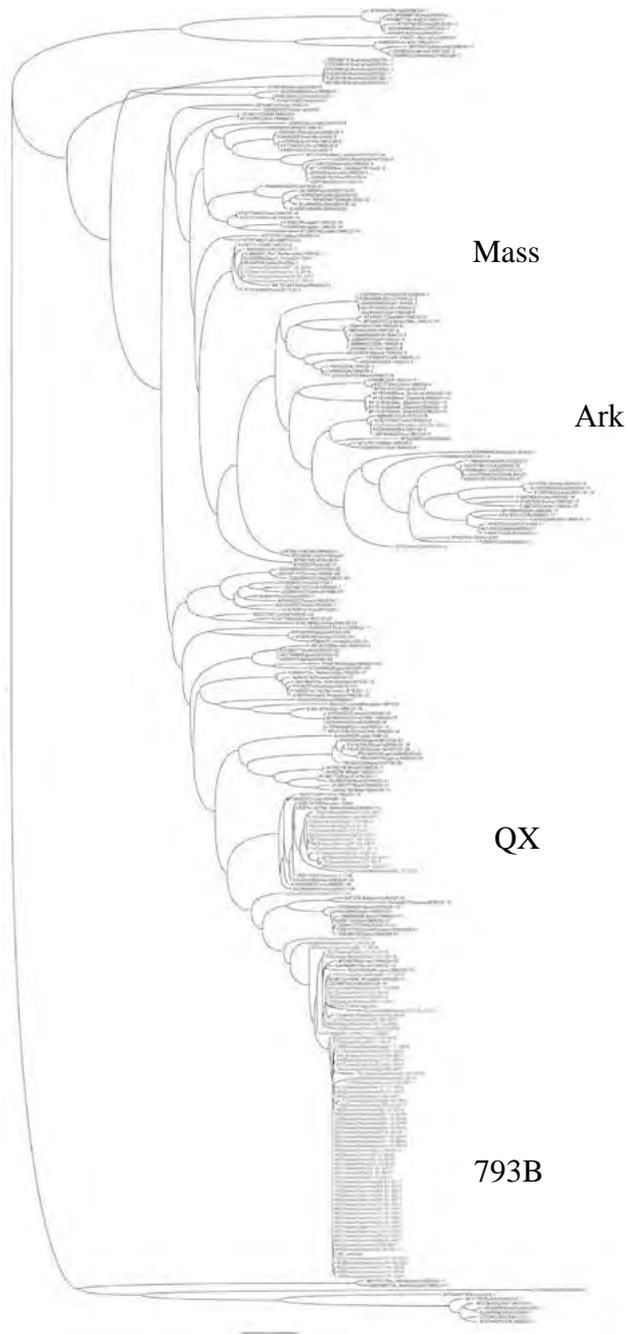
1. Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38: 281–297. 2007.
2. Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton, and C. J. Naylor. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28: 593–605. 1999.
3. Cecchinato, M., E. Catelli, C. Lupini, E. Ricchizzi, J. Clubbe, M. Battilani, and C. J. Naylor. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Vet. Microbiol.* 146: 24–34. 2010.

4. Cook, J. K. A., M. Jackwood, and R. C. Jones. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41: 239–250. 2012.
5. Cook, J. K. A., S. J. Orbell, M. A. Woods, and M. B. Huggins. Avian Pathology Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28: 477–485. 1999.
6. Devleeschauwer, B., P. Torgerson, J. Charlier, B. Leveck, N. Praet, P. Dorny, D. Berkvens, and N. Speybroeck. Prevalence: tools for prevalence assessment studies. R Packag. version 0.3. 0. 2014.
7. Franzo, A. A Sensitive, Reproducible, and Economic Real-Time Reverse Transcription PCR Detecting Avian Metapneumovirus Subtypes A and B. *Avian Dis.* 58: 216–222. 2014.
8. Franzo, G., P. Massi, C. M. Tucciarone, I. Barbieri, G. Tosi, L. Fiorentini, M. Ciccozzi, A. Lavazza, M. Cecchinato, and A. Moreno. Think globally, act locally: Phylodynamic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. *PLoS One* 12. 2017.
9. Franzo, G., C. J. Naylor, C. Lupini, M. Drigo, E. Catelli, V. Listorti, P. Pesente, D. Giovanardi, E. Morandini, and M. Cecchinato. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine* 32: 6765–6767. 2014.
10. Franzo, G., C. M. Tucciarone, A. Blanco, M. Nofrías, M. Biarnés, M. Cortey, N. Majó, E. Catelli, and M. Cecchinato. Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34: 5670–5676. 2016.
11. Geerligs, H. J., G.-J. Boelm, C. A. M. Meinders, B. G. E. Stuurman, J. Symons, J. Tarres-Call, T. Bru, R. Vila, M. Mombarg, K. Karaca, W. Wijmenga, and M. Kumar. Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathol.* 40: 93–102. 2011.
12. Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307–321. 2010.
13. Jackwood, M. W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Dis.* 7: 634–641. 2012.
14. Martin, D. P., B. Murrell, M. Golden, A. Khoosal, and B. Muhire. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1: 1–5. 2015.
15. Di Matteo, A. M., M. C. Sonez, C. M. Plano, and I. von Lawzewitsch. Morphologic observations on respiratory tracts of chickens after hatchery infectious bronchitis vaccination and formaldehyde fumigation. *Avian Dis.* 44: 507–518. 2000.
16. McKinley, E. T., D. A. Hilt, and M. W. Jackwood. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 26: 1274–1284. 2008.
17. Moreno, A., G. Franzo, P. Massi, G. Tosi, A. Blanco, N. Antilles, M. Biarnes, N. Majó, M. Nofrías, R. Dolz, D. Lelli, E. Sozzi, A. Lavazza, and M. Cecchinato.

- A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. *Avian Pathol.* 46: 1–28. 2016.
18. Standley, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.(outlines version 7). *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780. 2013.
  19. Terregino, C., A. Toffan, M. S. Beato, R. De Nardi, M. Vascellari, A. Meini, G. Ortali, M. Mancin, and I. Capua. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 37: 487–493. 2008.
  20. Tucciarone, C. M., M. Andreopoulou, G. Franzo, Z. Prentza, I. Chaligiannis, and M. Cecchinato. First Identification and Molecular Characterization of Avian metapneumovirus Subtype B from Chickens in Greece. *Avian Dis.* 61. 2017.
  21. Tucciarone, C. M., G. Franzo, G. Berto, M. Drigo, G. Ramon, K. C. Koutoulis, E. Catelli, and M. Cecchinato. Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-Time RT-PCR quantification. *Poult. Sci.* 97. 2018.
  22. Tucciarone, C. M., G. Franzo, C. Lupini, C. T. Alejo, V. Listorti, G. Mescolini, P. E. Brandão, M. Martini, E. Catelli, and M. Cecchinato. Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 2017.
  23. Valastro, V., E. C. Holmes, P. Britton, A. Fusaro, M. W. Jackwood, G. Cattoli, and I. Monne. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 39: 349–364. 2016.
  24. Winterfield, R. W., and A. M. Fadly. Some Characteristics of Isolates of Infectious Bronchitis Virus from Commercial Vaccines. *Avian Dis.* 16: 746–+. 1972.25. De Wit, J. J., J. K. a Cook, and H. M. J. F. van der Heijden. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40: 223–35. 2011.
  26. De Wit, J. J., W. A. J. M. Swart, and T. H. F. Fabri. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the alpha-IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. *Avian Pathol.* 39: 123–31. 2010.



**Figura 1.** Mappa riportante la localizzazione degli allevamenti di broiler (cerchio) e ovaiole (triangolo). Gli allevamenti sono stati colorati sulla base della positività a IBV (sinistra) e aMPV (destra). Nel caso di IBV viene riportata anche la distinzione fra ceppi di campo e vaccinali.



**Figura 2.** Albero filogenetico ricostruito con il metodo di Maximum likelihood al fine di comparare le sequenze parziali della regione S1 ottenute nel presente studio (evidenziate in rosso) con le referenze proposte da Valastro et al.,2016 (23).

## ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI CIRCOLANTI IN ITALIA

Lupini C., Mescolin G., Alastra G., Silveria F., Felice V., Catelli E.

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

### Summary

Molecular characterization of two Italian turkey haemorrhagic enteritis virus (THEV) strains, detected in 2009 and 2016, was performed. ORF1, *fiber knob domain*, E3 and hexon genes were sequenced; sequences were aligned and compared with homologous sequences retrieved from *GenBank*. Italian THEV were closely related each other (99% identity) and possessed four peculiar nucleotide mutations in the hexon gene. Phylogenetic analysis of ORF1, *fiber knob domain* and E3 sequences showed a close relationship of the Italian isolates to field avirulent THEV strains.

### INTRODUZIONE

L'enterite emorragica è una malattia virale del tacchino che colpisce soggetti a partire dalla quarta settimana di vita. In animali sensibili, la forma clinica è caratterizzata da depressione, morte improvvisa e feci sanguinolente. L'importanza economica di questa malattia è dovuta alla mortalità da essa provocata, che può raggiungere anche il 60%, ed alla immunodepressione transitoria ad essa associata che può favorire l'insorgenza di altre patologie. L'agente eziologico dell'enterite emorragica è *Turkey siadenovirus A* (THEV), genere *Siadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*. Il virus ha un DNA lineare a doppio filamento, costituito da 26.263 pb e presenta un antigene di superficie principale denominato Exon.

Oltre ai ceppi virulenti, nell'allevamento del tacchino, comunemente si riscontrano ceppi di THEV considerati naturalmente apatogeni (THEV-A) in grado di replicare efficientemente, inducendo splenomegalia e immunosoppressione senza tuttavia provocare lesioni all'intestino e mortalità (Alkie et al., 2017; Beach et al., 2009a). L'analisi di sequenza di genomi completi di ceppi di THEV a diversa virulenza ha portato ad ipotizzare che le basi molecolari della patogenicità siano correlate a mutazioni riscontrate nei geni ORF1, E3 e *Fiber knob domain* (Beach et al., 2009b).

Scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare da un punto di vista molecolare, mediante analisi di sequenza i geni ORF1, E3, *Fiber knob domain* ed hexon, due ceppi di THEV evidenziati in allevamenti di tacchino del nostro Paese.

### MATERIALI E METODI

#### *Ceppi virali*

Sono stati analizzati due ceppi italiani di THEV, evidenziati nel 2009 e nel 2016 (denominati rispettivamente THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16), in tacchini da carne di circa 10 settimane di età, vaccinati con vaccino spento (ceppo Domermuth) a 4 settimane.

Entrambi i gruppi non mostravano sintomatologia riferibile ad Enterite Emorragica.

#### *Estrazione*

L'estrazione del DNA virale è stata effettuata con il kit del commercio *QIAamp DNA Mini Kit*<sup>®</sup> (Qiagen), seguendo le istruzioni della casa produttrice, a partire da sospensioni di pool di tamponi cloacali in PBS, già risultati positivi a PCR per diagnosi THEV (Giovanardi *et al.*, 2014)

#### *Amplificazione dei geni ORF1, E3, Fiber knob domain e Hexon*

Per l'amplificazione dei geni ORF1, E3 e *Fiber knob domain* sono stati disegnati *primers* ad hoc (tabella 1), mentre per il gene Hexon, sono stati utilizzati i *primers* riportati da Hess *et al.*, 2009.

#### *Analisi di sequenza*

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Milano, Italia), e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Madrid, Spain).

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate, allineate e confrontate, mediante il *software* Bioedit, con sequenze omologhe di ceppi THEV presenti nel database *GenBank*. Gli alberi filogenetici sono stati quindi costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood del *software* Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). I valori di *bootstrap*, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

### **RISULTATI e DISCUSSIONE**

Le PCR eseguite sui ceppi THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16 ed il successivo sequenziamento hanno permesso di ottenere le sequenze geniche delle dimensioni attese, in particolare: ORF 1 (nt 70-2.200), E3 (nt 21.070-22.300), *fiber knob domain* (nt 23.386-23.880) ed hexon (nt 13.610-16.330), pari a circa il 25% dell'intero genoma. L'analisi delle sequenze ha messo in evidenza una identità maggiore del 99% fra i due ceppi italiani analizzati. Sono state riscontrate unicamente 7 mutazioni nucleotidiche, di cui 6 codificanti. Si può quindi dedurre una stabilità genetica di THEV nel tempo.

Il paragone delle sequenze ottenute con le omologhe disponibili in *Genbank*, ha permesso di evidenziare, a livello di gene hexon, 4 mutazioni uniche dei ceppi Italiani (posizioni nucleotidiche nel gene hexon: 1472 T>C; 1889 C>T; 2093 A>T; 2423 A>G). L'albero filogenetico costruito con le sequenze del gene hexon conferma la peculiarità dei ceppi italiani che formano un cluster distinto dagli altri ceppi disponibili e dal ceppo vaccino le Domermuth (figura 1). Il riscontro di mutazioni peculiari, se confermato da un più ampio studio di epidemiologia molecolare, potrà risultare utile strumento per la differenziazione dei ceppi di campo dai ceppi vaccinali.

L'analisi filogenetica dei geni ORF1, E3 e *Fiber knob domain*, nei quali, secondo Beach *et al.* (2009b) risiedono le basi molecolari della virulenza di THEV, mostra come i ceppi italiani siano geneticamente vicini a THEV-A (figura 2). A supporto di quanto emerso dai dati molecolari è importante sottolineare che nei gruppi

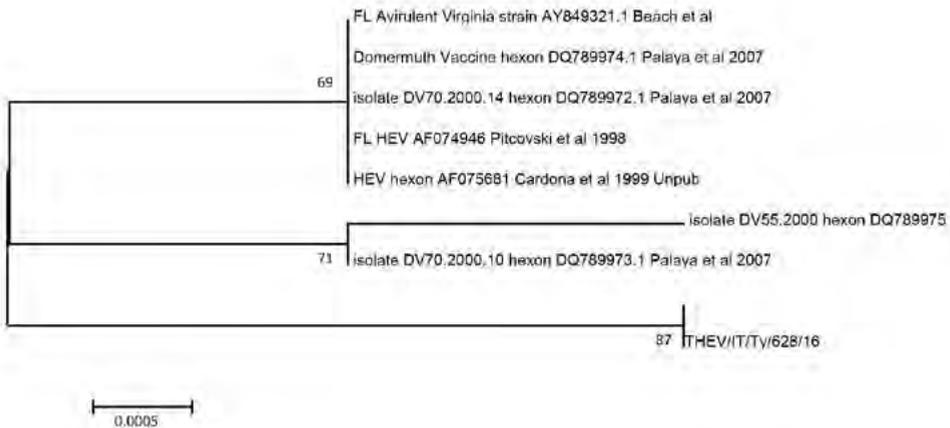
di tacchini dove i virus erano stati evidenziati, erano assenti sintomatologia clinica e lesioni anatomopatologiche tipiche della Enterite Emorragica. Tuttavia è possibile avere informazioni conclusive sulle caratteristiche di virulenza dei ceppi analizzati solo a seguito di studi di patogenicità *in vivo* su tacchini sensibili.

## BIBLIOGRAFIA

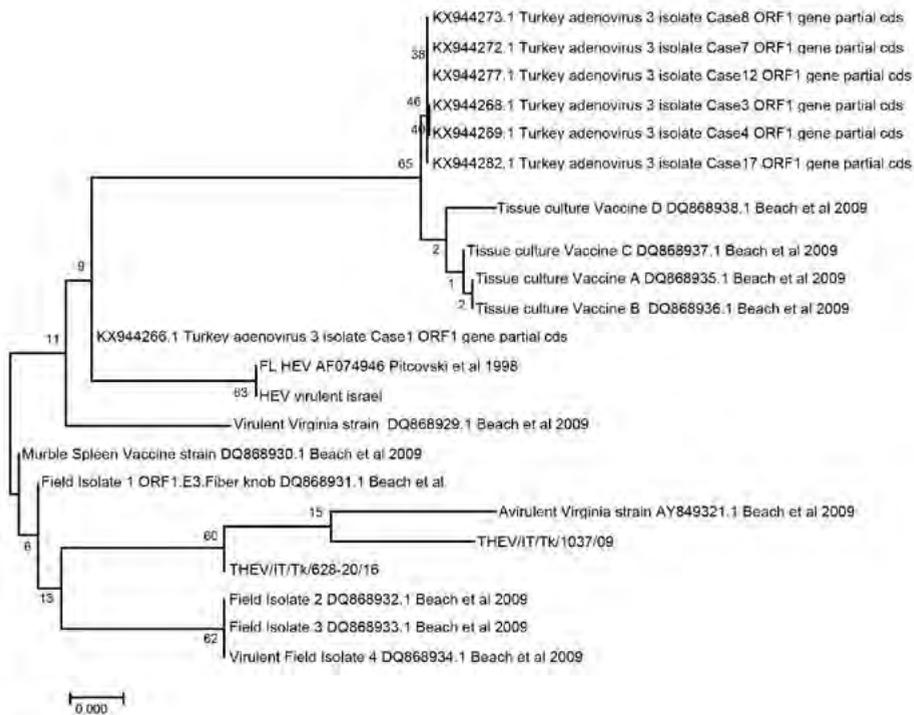
1. Alkie T.N., Guenther R. and S. Rautenschlein (2017) Molecular Characterization of Hemorrhagic Enteritis Viruses (HEV) Detected in HEV-Vaccinated Commercial Turkey Flocks in Germany. *Avian Diseases*, 61(1):96-101.
2. Beach, N. M., R. B. Duncan, C. T. Larsen, X. J. Meng, N. Sriranganathan, and F. W. Pierson. (2009a) Persistent infection of turkeys with an avirulent strain of turkey hemorrhagic enteritis virus. *Avian Diseases*. 53:370–375.
3. Beach N.M., Duncan R.B., Calvert T.L., Meng X.J., N. Sriranganathan and F.W. Pierson (2009b) Comparison of 12 turkey hemorrhagic enteritis virus isolates allows prediction of genetic factors affecting virulence. *Journal of General Virology*, 90, 1978–1985.
4. Giovanardi, D., C. Lupini, P. Pesente, G. Rossi, G. Ortali, and E. Catelli. (2014) Longitudinal field studies of avian metapneumovirus and turkey hemorrhagic enteritis virus in turkeys suffering from colibacillosis associated mortality. *Veterinary Research Communication*, 38:129–137. 2014.
5. Hess M, Raue R, Hafez HM (1999) PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. *Journal of Virological Methods*, 81:199–203
6. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and S Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution* 30: 2725-2729.

**Tabella 1** Primers utilizzati per amplificare i geni *ORF1*, *E3* e *Fiber*

Gene	Dimensione dell'amplificato	Primer <i>forward</i> (sequenza 5'-3')	Primer <i>reverse</i> (sequenza 5'-3')
<b>ORF1</b>	1150	GGATTCGGCTTGAAAAGTG	GGAGAATAAGTAATAGGC
	1215	GGAGTTGTGCACTTGTTTGC	CACTGCCAGCACCAACTAAG
	860	CAGGGTAGCGCTTTGTC	ACATGCGTTTTTTGTTTTCTTT
<b>E3</b>	1420	CATTGCCGACTATTGCAGAA	TAGACCGCTAGCAACACAGC
<b>FIBER</b>	915	GCCCTTTGTCAGCAGATGAT	TTCGCGCCACAGCATTACTA



**Figura 1.** Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche del gene hexon dei ceppi THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16 analizzati in questo studio e dei ceppi di THEV presenti sul database *Genbank*.



**Figura 2.** Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche del gene ORF1 dei ceppi THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16 analizzati in questo studio e dei ceppi di THEV presenti sul database *Genbank*.

## INDAGINE DI CAMPO SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS IMMUNOSOPPRESSIVI NEL POLLO DA CARNE

Lupini C., Mescolini G., Quaglia G., Silveira F., Felice V., Catelli E.

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

### Summary

Immunosuppressive viral diseases threaten the poultry industry by causing economic losses mainly as a result of birds' increased susceptibility to secondary infections and sub-optimal response to vaccinations. The major non-oncogenic immunosuppressive viruses of chickens are Infectious bursal disease virus (IBDV) and Chicken infectious anemia virus (CIAV).

In order to detect and molecularly characterize IBDV and CIAV circulating in a Northern Italian broiler farm, a longitudinal study was performed in two flocks of female birds for the duration of production cycle. Weekly, five birds/flock were humanely euthanized and Bursa of Fabricius were collected, pooled and subjected to PCR or RT-PCR. In both groups CIAV was detected consecutively from 3 to 6 weeks of age and sequencing of the strains showed that they grouped with genogroup III. An IBDV strain, belonging to the ITA genotype was detected at four weeks of age although the birds were vaccinated for IBDV at the hatchery.

### INTRODUZIONE

Le malattie virali immunosoppressive causano perdite economiche nell'industria avicola poiché determinano maggiore sensibilità degli animali alle infezioni secondarie e compromettono la risposta immunitaria alle vaccinazioni. Il virus della Bursite Infettiva (IBDV) e quello dell'Anemia Infettiva del pollo (CIAV) sono i principali virus immunosoppressivi, non-oncogeni che colpiscono il pollo (Balamurugan and Kataria, 2006).

IBDV è un virus a RNA della famiglia *Birnaviridae*. È l'agente eziologico della Bursite Infettiva, i cui quadri clinici possono variare, a seconda della patogenicità del ceppo virale, da forme molto gravi, con mortalità ed immunodepressione, a forme subcliniche in cui l'aspetto saliente è esclusivamente la immunodepressione. L'infezione da IBDV coinvolge principalmente i linfociti della linea B della borsa di Fabricio determinando una soppressione anche di lunga durata della risposta anticorpale primaria (Etteradossi and Saif, 2008).

CIAV è un virus a DNA appartenente alla famiglia *Anelloviridae*, genere *Gyrovirus*. L'infezione provoca forma clinica quando avviene per via verticale, o orizzontale, nelle prime settimane di vita. Tuttavia, la maggior parte dei polli è protetta dall'infezione precoce grazie agli anticorpi vaccinali di origine materna. L'infezione dopo le 3 settimane di età si manifesta prevalentemente in maniera subclinica ma può causare una significativa immunosoppressione. Le cellule target del virus sono gli emocitoblasti nel midollo osseo e i precursori dei linfociti T (Balamurugan and Kataria, 2006).

Allo scopo di evidenziare e caratterizzare dal punto di vista molecolare ceppi di IBDV e CIAV circolanti nell'allevamento del broiler in Nord Italia, è stato svolto uno studio longitudinale in due gruppi di femmine, dalla nascita sino alla macellazione.

## **MATERIALI E METODI**

### *Gruppi oggetto dello studio e campionamento*

Sono stati oggetti dello studio due gruppi di broiler femmine, di circa 25.000 animali ciascuno, siti in un'area ad elevata densità avicola del Nord Italia. Gli animali erano stati oggetto di profilassi vaccinale in incubatoio nei confronti della Bursite Infettiva, della Malattia di Newcastle, della Malattia di Marek e della Bronchite Infettiva. A 5, 13, 18, 26, 35 e 40 giorni d'età, le Borse di Fabrizio di 5 polli per gruppo, selezionati random e soppressi, sono state raccolte e processate in pool per i successivi esami molecolari.

### *Estrazione dell'RNA e del DNA virale*

A partire da omogenati di borse in PBS, l'estrazione dell'RNA e del DNA virale è stata effettuata mediante kit del commercio QIAamp Viral RNA® (Qiagen) e QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen).

### *RT-PCR per IBDV*

IBDV è stato evidenziato mediante RT-PCR, eseguita secondo il protocollo descritto da Jackwood et al. (2006), che consente di amplificare un frammento di 743pb del gene codificante per la VP2, situato nella regione ipervariabile della stessa.

### *PCR per CIAV*

Allo scopo di evidenziare la presenza di CIAV, il DNA estratto è stato amplificato secondo quanto riportato da Oluwayelu *et al.*, (2005) utilizzando i seguenti primer CUX-1 F 5'-CTG TTC CGA CAC ATT GAA ACC-3' e CUX-1 R 5'-CCC CAG TAC ATG GTG CTG TT-3'.

### *Analisi di sequenza*

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Milano, Italia), e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Madrid, Spain).

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate, allineate e confrontate, mediante il *software* Bioedit, con sequenze omologhe presenti nel database *GenBank*. Gli alberi filogenetici sono stati quindi costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood del *software* Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). I valori di *bootstrap*, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

## **RISULTATI e DISCUSSIONE**

CIAV è stato riscontrato dalla 3<sup>a</sup> alla 6<sup>a</sup> settimana di vita in entrambe i gruppi oggetto di studio. L'analisi filogenetica ha permesso di classificare i ceppi CIAV rilevati come appartenente al genotipo III (figura 1).

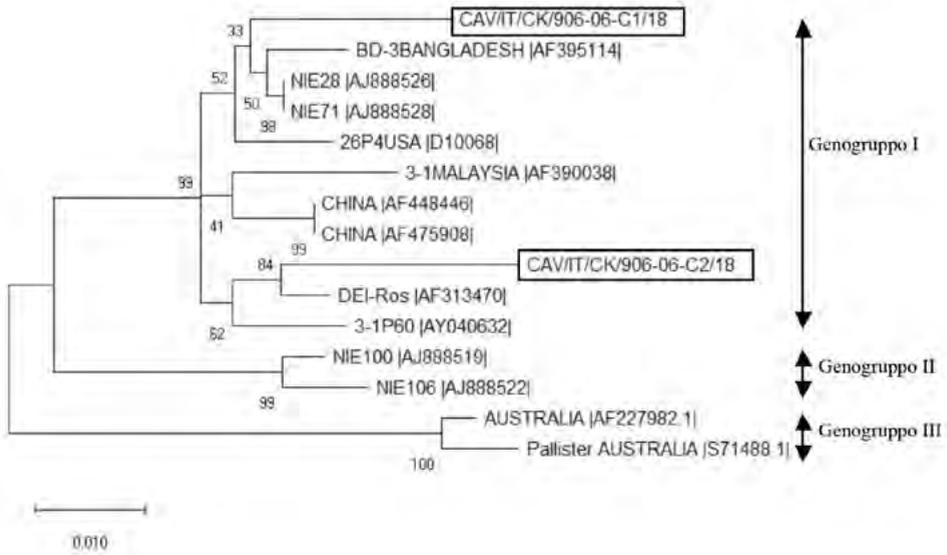
Un ceppo IBDV, appartenente al genotipo ITA (figura 2), è stato riscontrato a 4 settimane di vita nonostante i polli fossero vaccinati per IBDV in incubatoio. Tale genotipo circola nel nostro paese dal 2011 (Lupini *et al.*, 2016a), ha caratteristiche genetiche peculiari (Felice *et al.*, 2016) e mostra in condizioni sperimentali patogenicità simili a quelle riportate per i ceppi *varianti* di IBDV (Lupini *et al.*, 2016b).

## BIBLIOGRAFIA

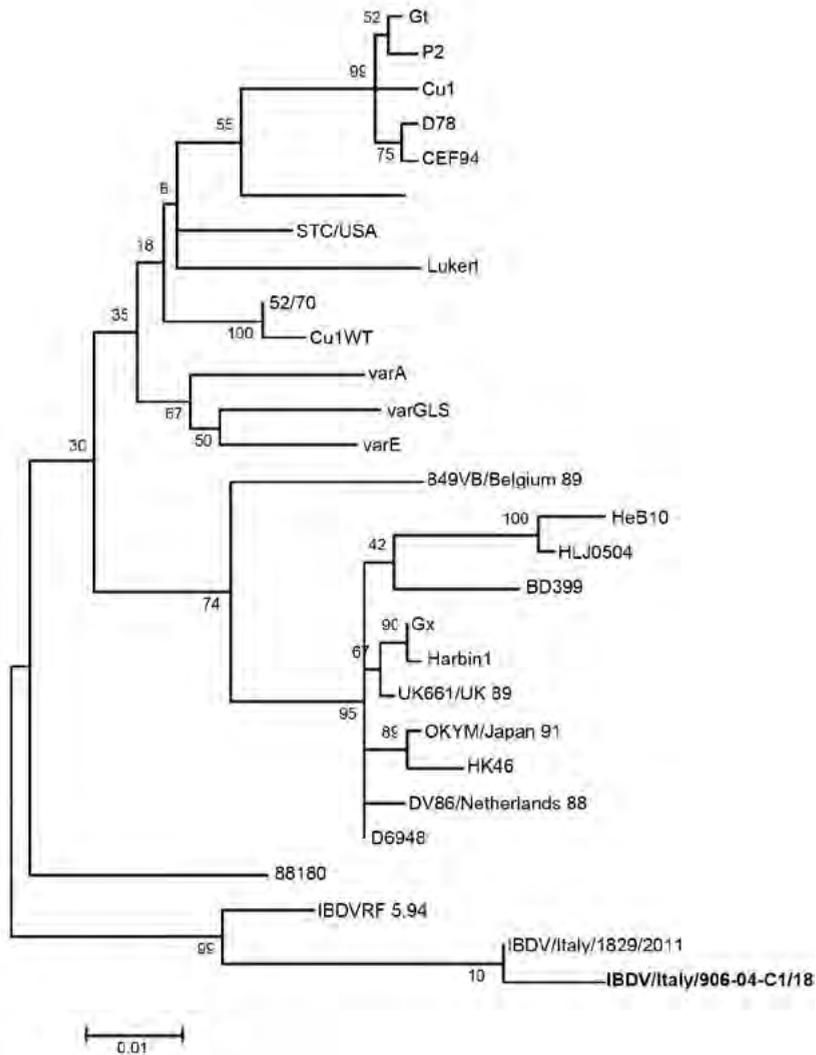
1. Balamurugan, V. and Kataria, J.M., 2006. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken—current status. *Veterinary Research Communications*, 30(5), 541–566
2. Etteradossi N., Saif Y. M. (2008). Infectious bursal disease. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson S.R., McDougald L.R., Nolan L.R., Swayne D.E. (Eds). *Diseases of Poultry 12<sup>th</sup> Edition* pp. 185-208.
3. Jackwood D.J., Cookson K.C., Sommer-Wagner S.E., Le Galludec H., De Wit J.J. (2006). Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis.* 50:532-536.
4. D.O. Oluwayelu, D. Todd, N.W. Ball, A.N.J. Scott, O.A. Oladele, B.O. Emikpe, O.A. Fagbohun, A.A. Owoade, and O.D. Olaleye (2005) Isolation and Preliminary Characterization of Chicken Anemia Virus from Chickens in Nigeria. *Avian Diseases*, 49(3):446-450.
5. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and S Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution* 30: 2725-2729.

**Tabella 1.** Risultati dell'analisi molecolare per la ricerca di CIAV e IBDV nei gruppi campionati

Giorni di vita	CIAV		IBDV	
	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 1	Gruppo 2
5	-	-	-	-
13	-	-	-	-
18	+	+	-	-
26	+	+	+	+
35	+	+	-	-
40	+	+	-	-



**Figura 1.** Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche di ceppi selezionati CIAV evidenziati in questo studio (denominati CAV/IT/CK/906-06-C1/18 e CAV/IT/CK/906-06-C2/18) e dei ceppi presenti sul database *Genbank*.



**Figura 2.** Albero filogenetico ottenuto dalla sequenza nucleotidica di IBDV evidenziato in questo studio (denominato IBDV/Italy/906-04-C1/18) e di ceppi di riferimento presenti sul database *Genbank*.



## ANALISI FILOGENETICA DI CEPPI DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE CIRCOLANTI IN EUROPA

Mescolini G.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Tucciarone C.M.<sup>2</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Blanco A.<sup>3</sup>, Biarnes M.<sup>3</sup>, Legnardi M.<sup>2</sup>, Silveira F.<sup>1</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) - Italia.*

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

<sup>3</sup> *CESAC - Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó, Ctra. Castellvell, s/n, Reus, 43206 Spain.*

### Summary

Sequences of partial G gene of European subtype B Avian Metapneumovirus (aMPV) strains, collected from 2014 to 2018, during routine molecular diagnostic activity, were analyzed. Nucleotide and amino acid sequences were edited and assembled using BioEdit software, aligned using Clustal W and compared with sequences of subtype B aMPVs collected prior to that period or sequences retrieved from GenBank. Sequences of most commonly used commercial vaccine strains were also included. Phylogenetic analysis, performed using Maximum Likelihood method, demonstrated that aMPV subtype B has evolved in Europe from its first appearance. In recent times different field virus populations co-exist in Europe (maximum genetic distance 5,5%) suggesting that the protection achieved using current commercial vaccines should be reevaluated. Along with field strains, a few vaccine-derived viruses are circulating. These strains were found sometimes during outbreaks of respiratory disease, confirming that reversion to virulence of live vaccines is likely to occur. The insights offered by the molecular characterization of aMPVs circulating in poultry could allow to better address the strategies to control aMPV infection in poultry.

### INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus aviare* (aMPV) è un virus a RNA non segmentato, a singolo filamento con polarità negativa appartenente all'ordine *Mononegavirales*, famiglia *Pneumoviridae*, genere *Metapneumovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2015). Il virus viene classificato in 4 sottotipi (A, B, C e D) distinguibili in base alle caratteristiche antigeniche e genetiche (Juhász and Easton, 1994; Bayon-Auboyer et al., 2000; Seal, 2000). aMPV riconosce come ospiti naturali il tacchino (Jones e Rautenschlein, 2013) il pollo (Hafez, 1993), la faraona (Cecchinato et al., 2013b), il fagiano (Catelli et al., 2001) e l'anatra (Toquin et al., 1999). Nel tacchino e nel pollo l'infezione da *Metapneumovirus* può indurre una forma respiratoria che nel tacchino prende il nome di Rinotracheite del Tacchino (TRT) e nel pollo è caratterizzata da sintomatologia clinica più lieve, ma può esitare nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). In entrambe le specie il virus può causare cali dell'ovodeposizione.

In Europa i primi isolamenti del virus risalgono alla seconda metà degli anni

'80 (McDougall and Cook, 1986). Solo a partire del 1994, i ceppi circolanti in Europa sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare e riconosciuti in prevalenza appartenenti ai sottotipi A e B (Juhász and Easton, 1994).

Per il controllo della malattia, a partire dagli anni '90 sono stati messi a punto, e resi disponibili in commercio, vaccini vivi attenuati o inattivati.

A tutt'oggi aMPV si può considerare endemico in Europa. Dati relativi alle caratteristiche molecolari dei ceppi circolanti sono piuttosto scarsi e limitati a pochi paesi europei (Franzo et al., 2017; Tucciarone et al., 2017, 2018). Il sottotipo B risulta comunque essere il prevalente.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di ampliare le informazioni disponibili sull'epidemiologia molecolare di aMPV caratterizzando ceppi appartenenti al sottotipo B evidenziati negli ultimi anni in Europa.

## **MATERIALI E METODI**

### **Campioni**

Sono stati analizzati 90 ceppi di aMPV sottotipo B evidenziati negli anni 2014-2018 durante attività diagnostica di routine eseguita dall'Università di Bologna, dall'Università di Padova e, in Spagna, dal Centre de Sanitat Avícola De Catalunya – CESAC. I campioni di partenza erano costituiti da tamponi rino-faringei prelevati da gruppi di polli o tacchini, vaccinati o meno per aMPV. I ceppi provenivano da 5 Paesi Europei, in particolare da Francia (n.15), Germania (n.1), Italia (n.9), Romania (n.29) e Spagna (n.36).

### **Estrazione dell'RNA e RT-PCR per aMPV**

L'RNA veniva estratto da pool di 10 tamponi, quindi analizzato con due approcci diversi a seconda del laboratorio. All'Università di Bologna e al CESAC veniva eseguita una RT-nested PCR per aMPV sottotipo specifica in grado di evidenziare e distinguere i sottotipi A e B tramite amplificazione di un frammento del gene G (Cavanagh et al., 1999). All'Università di Padova questo protocollo era preceduto da Real-Time RT-PCR di screening anch'essa sottotipo A e B specifica (Cecchinato et al., 2013a).

### **Analisi di sequenza e filogenetica**

I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati, le sequenze analizzate con l'ausilio del *software* BioEdit Alignment Editor, allineate utilizzando l'accessory application Clustal W e confrontate con sequenze omologhe, di ceppi aMPV-B evidenziati in Europa a partire dalla seconda metà degli anni '80, di vaccini aMPV sottotipo B comunemente impiegati in Europa e di altri ceppi Europei disponibili in GenBank. L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando il metodo Maximum Likelihood nel programma MEGA7.

## **RISULTATI**

L'albero filogenetico generato con le sequenze ottenute mostra un'evoluzione di aMPV sottotipo B negli anni (massima distanza genetica 5,5%). Sono evidenti diversi cluster strettamente correlati all'origine geografica dei ceppi (come nel caso di Italia, Francia, Romania e Spagna) e cluster popolati da virus provenienti da paesi diversi (Italia e Grecia) (Figura 1).

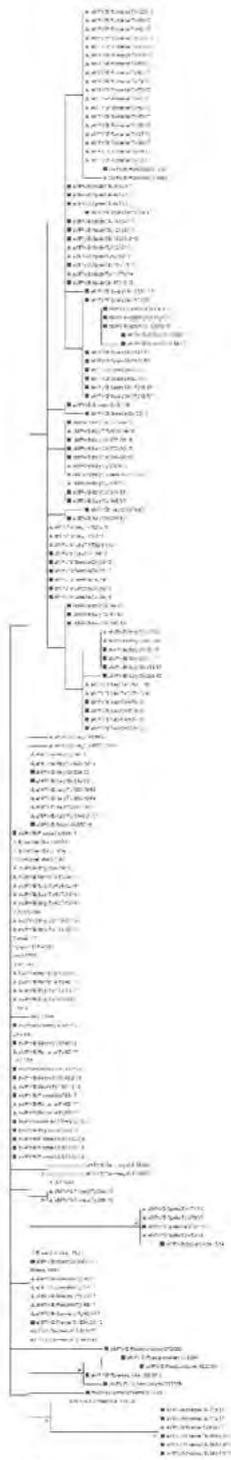
I ceppi isolati prima del 2000 formano un cluster distinto assieme ai vaccini e ad un consistente numero di virus analizzati nel presente studio che, per queste caratteristiche genetiche, sono da considerarsi di derivazione vaccinale.

L'analisi filogenetica non ha permesso di evidenziare correlazione con la specie ospite: ceppi circolanti in polli o tacchini rientrano indistintamente all'interno dello stesso cluster.

Gli alberi filogenetici costruiti con le sequenze provenienti dai singoli Paesi hanno mostrato come la popolazione virale Rumena sia piuttosto omogenea mentre quella Francese, Spagnola o Italiana mostri una certa eterogeneità, come si può evincere dal fatto che ci siano cluster distinti. Nel caso dei ceppi Italiani e Spagnoli è anche riscontrabile una certa evoluzione temporale.

## **DISCUSSIONE e CONCLUSIONI**

Nonostante il largo impiego della vaccinazione, l'infezione da aMPV rappresenta ancora un problema in Europa, probabilmente a causa dell'eterogeneità genetica del virus che tende ad evolvere nel tempo e nelle diverse aree geografiche (Cecchinato et al., 2010; Tucciarone et al., 2017) ed alla tendenza alla reversione a virulenza dei vaccini disponibili (Catelli et al., 2010). A conferma di ciò nel presente studio sono state evidenziate popolazioni virali di campo distinte sia fra i diversi Paesi, sia all'interno degli stessi, assieme a numerosi ceppi di origine vaccinale. Al fine di migliorare le strategie di profilassi nei riguardi di questa infezione sarà necessario valutare la protezione conferita dai vaccini disponibili in commercio nei confronti dei ceppi emergenti.



**Figura 1.** Albero filogenetico relativo a sequenze parziali del gene G di ceppi aMPV sottotipo B Europei e di ceppi vaccinali.

● vaccini; ■ pollo; ▲ tacchino; ◆ faraona.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bayon-Auboyer MH, Arnauld C, Toquin D and N Eterradossi (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.* 81, 2723–2733.
2. Catelli E, De Marco MA, Delogu M, Terregino C, and V. Guberti. (2001). Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Vet. Rec.* 149, 56–58.
3. Catelli E, Lupini C, Cecchinato M, Ricchizzi E, Brown P and CJ Naylor. (2010). Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity. *Vaccine* 28, 916–921.
4. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and CJ Naylor. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28, 593–605.
5. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani, M and CJ Naylor. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Vet. Microbiol.* 146, 24–34.
6. Cecchinato M, Lupini C, Munoz Pogoreltseva OS, Listorti V, Mondin A, Drigo M and E Catelli. (2013a). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathol.* 42, 283–289.
7. Cecchinato M, Morandini E, Listorti V, Lupini C, Pesente P, Giovanardi D, Rossi G, Sperati Ruffoni L and E Catelli. 2013b. Molecular characterization of an Avian Metapneumovirus strain isolated in
8. guinea fowls (*Numida meleagris*) experiencing respiratory disease. In: 18th World Veterinary Poultry Congress, Nantes, France, pp. 401–402.
9. Franzo G, Tucciarone CM, Enache M, Bejan V, Ramon G, Koutoulis KC and M Cecchinato. (2017). First Report of Avian Metapneumovirus Subtype B Field Strain in a Romanian Broiler Flock During an Outbreak of Respiratory Disease. *Avian Dis.* 61, 250–254.
10. Hafez HM. (1993). The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens - review. *Arch. FUR Geflugelkd.* 57, 181–185.
11. Jones RC and S Rautenschlein. (2013). Avian metapneumovirus. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L. and Nair, V. (eds) *Diseases of Poultry*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 125–138.
12. Juhasz K and AJ Easton. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: Evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75, 2873–2880.
13. McDougall JS and JK Cook. (1986). Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Vet. Rec.* 118, 206–207.
14. Seal BS. (2000). Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United States of America. *Anim Heal. Res Rev* 1, 67–72.
15. Toquin D, Bāyon-Auboyer MH, Eterradossi N, Jestin V and H Morin. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet Rec.* 145, 680.
16. Tucciarone CM, Andreopoulou M, Franzo G, Prentza Z, Chaligiannis I and M Cecchinato. (2017). First Identification and Molecular Characterization of Avian metapneumovirus Subtype B from Chickens in Greece. *Avian Dis.* 61.
17. Tucciarone CM, Franzo G, Lupini C, Alejo CT, Listorti V, Mescolini G, Brandão PE, Martini M, Catelli E and M Cecchinato. (2018). Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97, 503–509.



## CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPLO DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK RILEVATO IN TACCHINI DA CARNE CON FORMA VISCERALE

Mescolini G.<sup>1</sup>, Silveira F.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>2</sup>, Massi P.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – Italia.

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì, Via don Eugenio Servadei 3/E-3/F, 47122, Forlì (FC), Italia.

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD) - Italia.

### Summary

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative disease caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), which affects primarily the chicken. The virus is able to induce tumours also in turkeys, even if this finding is relatively unusual when compared to the frequency of occurrence in chickens. This study reports the detection and the molecular characterization of a GaHV-2 strain from a flock of Italian meat-type turkeys showing visceral lymphomas. The *meq* gene was sequenced, aligned and compared with reference strains and with other Italian GaHV-2 detected in the last few years. Results showed that the turkey MD virus has molecular features of high virulence and is closely related to MD strains detected in Italian commercial chickens.

### INTRODUZIONE

Il virus della malattia di Marek (MD) o *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2) è un herpesvirus appartenente alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, genere *Mardivirus*; l'ospite di elezione è il pollo dove il virus causa una patologia a carattere linfoproliferativo. Il virus riconosce quattro diversi patotipi denominati *mild*, *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus* (Schat e Nair, 2013).

Nel tacchino il virus è in grado di determinare forme tumorali sia a seguito di infezione sperimentale che naturale (Powell et al., 1984; Davidson et al., 2002; Pennycott and Venugopal, 2002; Deuchande et al., 2012; Blake-Dyke and Baigent, 2013). All'esame necroscopico i linfomi viscerali causati da GaHV-2 nel tacchino risultano indistinguibili da quelli determinati dal retrovirus della reticoloendoteliosi (REV) e da quello della malattia linfoproliferativa del tacchino (LPDV) (Schat e Nair, 2013; Nair et al., 2013). La diagnosi differenziale fra queste forme neoplastiche linfoproliferative non è sempre agevole poiché anche a livello istologico l'infiltrato può avere caratteristiche simili (Schat e Nair, 2013). Metodi molecolari specifici per GaHV-2, REV o LPDV, rappresentano quindi la scelta di elezione per la diagnosi.

Nel presente studio è riportato il riscontro e l'analisi molecolare di un ceppo di GaHV-2 in tacchini da carne allevati con metodo *free-range* ed affetti da lesioni viscerali neoplastiche.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campioni*

Nel 2016 sono stati conferiti presso l'IZLER, Sezione di Forlì, fegati di tacchini da carne bianchi, di 3-4 mesi di età, per approfondimenti diagnostici. I visceri erano stati prelevati da animali allevati in provincia di Viterbo (Lazio) e si presentavano fortemente aumentati di volume e con aree discolorate. L'allevamento era condotto al chiuso fino a 50 giorni di età, quindi fino alla macellazione, che avveniva a 5 mesi di età, in aree all'aperto recintate dotate di tettoie in corrispondenza delle mangiatoie e degli abbeveratoi.

In zone contigue ai recinti venivano allevati anche polli da carne all'aperto.

### *Estrazione del DNA*

Allo scopo di giungere a una diagnosi eziologica della forma linfoproliferativa, si è proceduto all'estrazione del DNA dai fegati mediante kit commerciale "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche).

### *PCR per REV e LPDV*

Il DNA provirale è stato quindi sottoposto a protocolli di PCR in grado di amplificare tratti specifici del genoma di REV (Abdel-Latif e Khalafalla, 2005) o LPDV (Allison et al., 2014).

### *PCR per GaHV-2, sequenziamento, analisi di sequenza e filogenetica del gene meq*

La PCR per GaHV-2 è stata eseguita seguendo il protocollo di Shamblin et al. (2004) che prevede l'amplificazione dell'intero gene *meq*.

I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati presso il centro di sequenziamento Macrogen Europe (Madrid). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit Sequence Alignment Editor, allineate e confrontate, utilizzando l'accessory application Clustal W, alle sequenze del gene *meq* di ceppi GaHV-2 di riferimento presenti in GenBank, ceppi di GaHV-2 rilevati recentemente in Italia in gruppi di ovaiole, riproduttori e broiler, e ceppi vaccinali tipo Rispens comunemente impiegati nel nostro Paese.

L'analisi delle sequenze amminoacidiche delle proteine Meq ha previsto il conteggio del numero delle sequenze di 4 proline (PPPP) all'interno delle ripetizioni ricche in prolina (Proline-Rich Repeats - PRR) nel dominio di transattivazione.

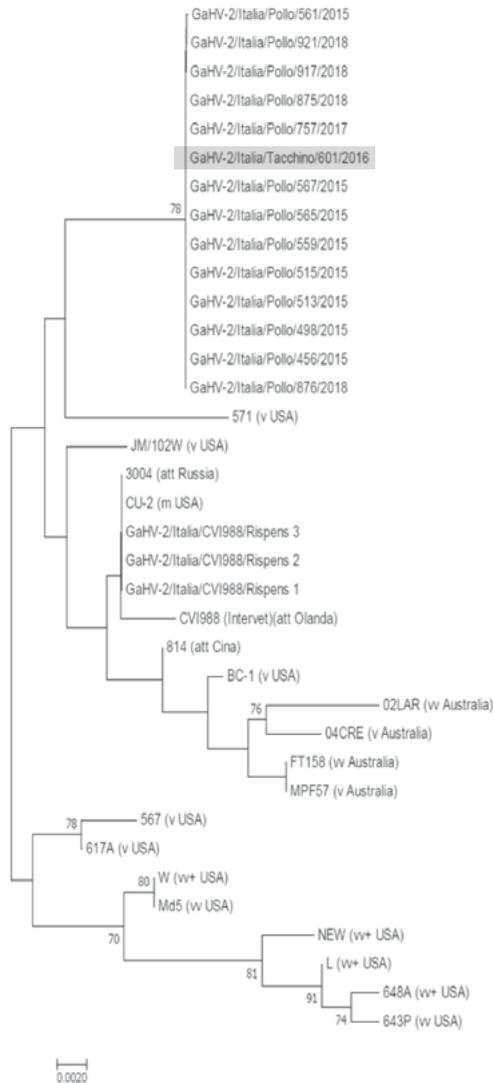
L'albero filogenetico è stato costruito sulle sequenze amminoacidiche del gene *meq* utilizzando l'algoritmo Neighbor-Joining col software MEGA7. Sono stati considerati attendibili i nodi dell'albero con valore di bootstrap, calcolato su 1000 replicati, uguale o maggiore di 70.

## **RISULTATI**

Il campione è risultato negativo alle PCR per REV e LPDV mentre è risultato positivo al protocollo di PCR per GaHV-2, producendo una banda di amplificazione delle dimensioni attese. Il ceppo virale rilevato è stato denominato GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016.

All'analisi di sequenza è stato possibile osservare che il gene *meq* del ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 codificava per un'isoforma della proteina Meq di 339 amminoacidi, e presentava nel dominio di transattivazione 4 sequenze PPPP, ed una

sequenza PPSP. La presenza di interruzioni dovute a mutazioni puntiformi nelle sequenze ricche in prolina è indice di elevata virulenza del ceppo virale. All'analisi filogenetica (Figura 1) il ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 formava un cluster unico con i ceppi evidenziati negli allevamenti industriali italiani a partire dal 2015.



**Figura 1.** Albero filogenetico generato con le sequenze amminoacidiche del gene *meq* del ceppo di GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 (evidenziato in verde), di ceppi GaHV-2 di riferimento presenti in GenBank, di ceppi di GaHV-2 Italiani e di 3 vaccini tipo Rispens.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato caratterizzato, tramite l'analisi del gene *meq*, un ceppo di GaHV-2 evidenziato in tacchini da carne affetti da una forma viscerale di MD. I tacchini in questione erano allevati in parchetti esterni in contiguità con polli da carne, anch'essi allevati all'aperto.

Rare sono le segnalazioni di MD nel tacchino nonostante in generale sia riconosciuta la sensibilità di questa specie al GaHV-2. Ciò può essere attribuito da un canto alla presenza ubiquitaria in questa specie dell'herpesvirus del tacchino (HVT) che probabilmente conferisce un certo grado di protezione nei confronti della malattia (Witter and Solomon, 1971) dall'altro al fatto che le varie linee genetiche di tacchino hanno diversi gradi di resistenza alla malattia (Davidson et al., 2002).

Nel caso da noi riportato è presumibile che i soggetti siano stati sottoposti ad una elevata pressione infettiva per la presenza contigua di un allevamento di polli. L'analisi filogenetica ha mostrato una strettissima correlazione fra il virus in esame e quelli attualmente circolanti negli allevamenti industriali supportando tale ipotesi. Come noto il virus si trasmette per contatto diretto o indiretto in modo molto efficiente mediante le desquamazioni cutanee, che albergano particelle virali infettanti.

Il gene *meq*, principale oncogene del virus, è stato scelto per la caratterizzazione del ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 a causa della sua variabilità che è correlabile al grado di virulenza (LEE et al., 2000; Chang et al., 2002; Shamblin et al., 2004). Shamblin et al. (2004) hanno osservato che il numero delle ripetizioni ricche in prolina è significativamente correlato con il patotipo virale: i ceppi con un numero maggiore di PRR mostravano una virulenza minore ed i ceppi a maggiore virulenza contenevano un numero minore di PRR e l'interruzione delle stesse a causa della sostituzione di una prolina con un altro amminoacido nella sequenza di 4 proline in successione in posizione 2 (PPPP -> P (Q/A) PP). Il ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 presentava nella proteina Meq caratteristiche di elevata virulenza a causa del basso numero di PRR nel dominio di transattivazione e un'interruzione di una sequenza di PPPP per la sostituzione di una P a S.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Latif MM and Al Khalafalla. (2005). Detection by PCR of Multiple Subgroups of Avian Leukosis Virus (ALV) in Broilers in the Sudan. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4, 407-413.
2. Allison AB, Kevin KM, Philips JE, Cartoceti AN, Munk BA, Nemeth NM, Welsh TI, Thomas JM, Crum JM, Lichtenwalner AB, Fadly AM, Zavala G, Holmes EC and JD Brown. (2014). Avian oncogenesis induced by lymphoproliferative disease virus: A neglected or emerging retroviral pathogen? *Virology* 450–451, 2–12.
3. Blake-Dyke C and S Baigent. (2013). Marek's disease in commercial turkey flocks. *Vet. Rec.* doi:10.1136/vr.f6229
4. Chang KS, Ohashi K and M Onuma. (2002). Suppression of transcription activity of the MEQ protein of oncogenic Marek's disease virus serotype 1 (MDV1) by L-MEQ of non-oncogenic MDV1. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1091–1095.
5. Davidson I, Malkinson M and Y Weisman. (2002). Marek's disease in turkeys. I. A seven-year survey of commercial flocks and experimental infection using two field isolates. *Avian Dis* 46, 314–321.

6. Deuchande R, Murphy A, Otter A, Baigent S, Wood A and RM Irvine. (2012). Marek's disease in turkeys. *Vet. Rec.* 171, 602.
7. Lee SI, Takagi M, Ohashi K, Sugimoto C and M Onuma. (2000). Difference in the meq Gene between Oncogenic and Attenuated Strains of Marek's Disease Virus Serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 287-292.
8. Nair V, Zavala G and AM Fadly. (2013). Reticuloendotheliosis. In: Diseases of Poultry, 13th- Edition, Swayne D. E. et al., Eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 593-604.
9. Pennycott TW and K Venugopal K. (2002). Outbreak of Marek's disease in a flock of turkeys in Scotland. *Vet. Rec.* 150, 277-279.
10. Powell PC, Howes K, Lawn AM, Mustill BM, Payne LN, Rennie M and MA Thompson. (1984). Marek's disease in turkeys: The induction of lesions and the establishment of lymphoid cell lines. *Avian Pathol.* 13, 201-214.
11. Schat KA and V. Nair. (2013). Marek's Disease. In: Diseases of Poultry, 13th- Edition, Swayne D. E. et al., Eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 515-552.
12. Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL and Parcels MS. (2004). Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: Association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Vet. Microbiol.* 102, 147-167.
13. Witter RL and JJ Solomon. (1971). Epidemiology of a herpesvirus of turkeys: possible sources and spread of infection in turkey flocks. *Infect. Immun.* 4, 356-361.



## INDAGINE SULLA PRESENZA DI *MYCOPLASMA SPP.* NELL'AVIFAUNA SELVATICA: RISULTATI PRELIMINARI

Moronato M.L.<sup>1</sup>, Fincato A.<sup>1</sup>, Boscarato M.<sup>1</sup>, Tonellato F.R.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>2</sup>, Gobbo F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 - Laboratorio di Medicina Aviare, Legnaro (Padova).

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 - Laboratorio di Medicina Aviare, Verona.

### Summary

Although the role of wild animals in the pathogenesis and epidemiology of many infectious diseases has been established, less is known about *Mycoplasma spp.* presence and distribution in wild birds in Italy. The availability of wild birds carcasses rescued from the CRAS of Rovigo and delivered to the Avian Medicine Laboratory of the IZSVe, allowed us to include also *Mycoplasma spp.* investigation in a monitoring program of infectious diseases (West Nile virus, Avian Influenza virus, Avian Paramyxovirus-1). A total number of 192 tracheal samples were collected from adult and sub adult wild birds, rescued from Venezia, Padova and Rovigo provinces and belonged to different avian species with migrating, partially migrating and residential behavior. Among the analyzed samples a total number of 48 tracheal swabs, belonging to different provinces and avian species, resulted positive for *Mycoplasma spp.* at cultivation.

Whereas the 16s-rDNA-PCR-DGGE for *Mycoplasma spp.* identification was not always conclusive, it was possible to exclude the presence of major avian mycoplasmas (i.e *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma iowae*).

These preliminary results evidence the presence of *Mycoplasma spp.* in different species of wild birds and suggest the need of deeper investigation on their characteristics (microbiology and identification), distribution, epidemiology and possible pathogenic role for poultry.

### INTRODUZIONE

Gli animali selvatici possono contribuire alla trasmissione e diffusione di importanti agenti patogeni. Nell'ambito delle micoplasmosi avicole l'attenzione della comunità scientifica e del campo si è concentrata principalmente su quelle specie batteriche considerate di impatto da un punto di vista sanitario ed economico, quali *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma meleagridis* e *Mycoplasma iowae*. Poche sono invece le informazioni disponibili sulla loro presenza nell'avifauna selvatica e sulla circolazione di altre specie di micoplasmi al di fuori del settore avicolo industriale e rurale, soprattutto in Italia.

Obiettivo del presente studio, del quale si riportano i risultati preliminari ad oggi disponibili, è valutare la presenza di *Mycoplasma spp.* nell'avifauna selvatica, stimarne la prevalenza ed indagarne il possibile ruolo epidemiologico.

Per tale scopo sono state utilizzate le carcasse di uccelli selvatici provenienti dal Centro Di Recupero Fauna Selvatica Provincia di Rovigo (CRAS) e conferite presso il Laboratorio di Medicina Aviare della SCT1 dell'Istituto Zooprofilattico

Sperimentale delle Venezie di Legnaro (Padova), dove nell'ambito delle attività di sorveglianza passiva della fauna selvatica per malattie quali la West Nile, l'Influenza aviaria e la Malattia di Newcastle, sono state campionate anche per la sorveglianza passiva di specie batteriche appartenenti al genere *Mycoplasma spp.*

## **MATERIALI E METODI**

Tra settembre 2017 e maggio 2018 un numero di 192 tamponi tracheali sono stati effettuati a partire da carcasse di soggetti adulti-subadulti dell'avifauna selvatica proveniente dalle province di Venezia, Padova e Rovigo.

Le matrici biologiche campionate sono state immediatamente congelate (-20°C) e stoccate in attesa di essere destinate all'isolamento culturale per *Mycoplasma spp.* secondo una procedura interna del laboratorio basata sul manuale OIE. Un numero complessivo di 192 campioni sono stati ad oggi stemperati in brodo culturale (Experience®), incubati a 37°C ed al 5% di CO<sub>2</sub> e giornalmente sono stati valutati eventuali segni di crescita/attività metabolica (cambiamento di colore o intorbidimento del terreno liquido, presenza di colonie di aspetto caratteristico – *eggshell fried colonies*- su terreno agarizzato). Ciascun campione è stato inoltre sottoposto su terreno solido ai test biochimici della nisina e della digitonina, con conferma della positività per *Mycoplasma spp.* qualora evidenziata, dopo 24 ore di incubazione, resistenza nei confronti della nisina (assenza di alone di inibizione) e sensibilità alla digitonina (presenza di alone di inibizione). Il campione è stato considerato negativo se dopo 3 settimane di incubazione non sono stati rilevati segni di crescita tipici del genere *Mycoplasma*.

In caso di positività all'esame culturale, un'aliquota di 300µL di brodocoltura è stata quindi sottoposta ad estrazione del DNA con lo strumento automatico Maxwell LEV® Blood DNA kit (Promega), secondo le indicazioni fornite dal produttore. L'identificazione e la differenziazione dei campioni è avvenuta tramite 16s-r-DNA-PCR-DGGE *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, secondo quanto descritto da Mc Auliffe *et al.* (2005).

In alcuni casi tale metodica non ha permesso di raggiungere ad oggi un'identificazione specifica di *Mycoplasma spp.* e si prevede quindi nel prossimo futuro di amplificare parte del gene 16s rRNA per il successivo sequenziamento, che avverrà secondo il metodo Sanger. I prodotti ottenuti dal sequenziamento saranno analizzati con l'utilizzo del software BLAST – *Basic Local Sequence Alignment*.

## **RISULTATI**

Complessivamente sono stati analizzati 192 campioni (tampone tracheale), di soggetti adulti e subadulti, afferenti a 48 specie selvatiche e provenienti dalle province di Venezia (128), Padova (17), Rovigo (41) e 6 campioni per i quali la georeferenziazione non risultava disponibile (figura 1). Di queste, 34 specie sono state classificate come uccelli migratori, 96 come parzialmente migratori e 62 come stanziali. Le specie selvatiche che sono state campionate e la relativa positività sono descritte in dettaglio in tabella 1.

48 campioni sono risultati positivi con il maggior numero di positività nella provincia di Venezia (33), seguita da quella di Rovigo (10) e Padova (4), mentre 1 campione risultato positivo non presentava riferimenti sulla zona di provenienza (figura 2).

Sulla base dei dati ad oggi disponibili è possibile evidenziare come il maggior numero

di campioni positivi sia stato riconosciuto in animali parzialmente migratori (30/96), seguiti dagli uccelli stanziali (16/62) ed infine dagli animali migratori (2/34) (figura 3). Nel dettaglio, tra gli animali parzialmente migratori analizzati è stato possibile riconoscere 1/1 campione positivo da colombaccio, 1/2 da falco pellegrino, 1/6 da gabbiano comune, 13/25 da gabbiano reale, 7/16 da gheppio, 2/5 da gufo comune, 1/6 da merlo, 1/7 da svasso, 2/6 da svasso maggiore e 1/2 da tuffetto. Per quanto concerne invece le specie stanziali sono state osservate le seguenti positività: 1/2 da cormorano, 1/2 da gazza ladra, 1/6 da piccione, 8/23 da poiana e 5/8 da tortora dal collare. Infine, per quanto concerne le specie migratorie è stata evidenziata 1/2 positività da falco di palude e 1/1 da nitticora.

Tutti i campioni risultati positivi all'esame colturale sono stati successivamente sottoposti a 16s-rDNA-PCR-DGGE per l'identificazione di specie di *Mollicutes*. Ciascuna analisi è stata svolta includendo, in ogni gel di DGGE, un pannello di controlli positivi di *Mycoplasma spp.* di pertinenza aviaria del settore industriale e rurale. L'identificazione di specie del campione incognito avviene tramite la comparazione del bandeggio evidenziato su gel con quello di controlli noti.

Tutti i campioni analizzati hanno evidenziato un bandeggio (*pattern*) collocato all'interno della zona di pertinenza dei micoplasmi, confermandone quindi il comportamento in sede microbiologica e la positività.

In nessun campione ad oggi analizzato è stato osservato il bandeggio specifico dei più noti micoplasmi del campo avicolo, quali *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* (MM), *M. iowae* (MI), *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners* e *M. imitans* (MIm). Nonostante ciò, un campione isolato da poiana ha evidenziato su gel di DGGE un *pattern* simile ad MS. Le caratteristiche metaboliche del ceppo evidenziate in fase microbiologica ed ulteriori approfondimenti biomolecolari hanno permesso di escludere questa possibilità, confermata anche dall'identificazione ottenuta tramite sequenziamento (99% *Mycoplasma* 27639).

Analogamente, un campione di gabbiano comune ritrovato in provincia di Venezia ha evidenziato un bandeggio situato nella zona di pertinenza di *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma imitans*, ma analisi biomolecolari aggiuntive hanno permesso di escludere la presenza di MG o MIm e di identificare la specie come 99% *Mycoplasma* 27635, filogeneticamente molto vicino a MG e MIm.

Tramite metodica DGGE è stato possibile identificare 3 campioni di tortora dal collare ed 1 di gheppio come positivi a *Mycoplasma columbinum*, mentre 4 campioni (piccione, colombaccio, gufo comune, tortora dal collare) sono stati identificati come *Mycoplasma columborale*.

Nella maggior parte dei casi l'identificazione di specie tramite questa metodica non è stata possibile, a causa della mancata corrispondenza tra il bandeggio espresso dai campioni analizzati e quello dei controlli inseriti; si prevede quindi di analizzare questi campioni tramite amplificazione di parte del gene 16s rRNA e successivo sequenziamento.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati preliminari ad oggi disponibili si può osservare come le attività di campionamento su avifauna selvatica adulta e sub-adulta, stanziale/parzialmente migratoria/migratoria abbiano evidenziato la positività per *Mycoplasma spp.* da tampone tracheale con una prevalenza del 25%. Risultano interessanti le numerose

positività del gabbiano reale, dei columbiformi e dei rapaci stanziali o migratori. La metodica DGGE tramite l'utilizzo di campioni noti (controlli positivi aviari di pertinenza industriale e rurale) non è risultata sempre conclusiva nella attribuzione di specie di *Mycoplasma spp.* ma ha comunque consentito di escludere l'appartenenza dei campioni selvatici alle specie di interesse per il settore industriale (MS, MG, MM, MI, MIm) o a specie di micoplasmi normalmente presenti nel settore rurale (*M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners*, *M. glycyphylum*, *M. pullorum*). D'altro canto in base ai dati disponibili in laboratorio possiamo affermare di non aver mai isolato micoplasmi dell'avifauna selvatica nel settore rurale od industriale. Seppur questo dato potesse risultare scontato nel settore industriale non si può dire la stessa cosa per quello rurale, in cui spesso gli animali vivono all'aperto, le misure di biosicurezza sono limitatissime e quindi la promiscuità con specie selvatiche può risultare frequente.

Questi dati che necessitano di ulteriori approfondimenti sembrano comunque escludere una possibile trasmissione di micoplasmi in ambito selvatico-rurale, selvatico-industriale e viceversa, o per la elevata speciazione di queste specie batteriche o per fattori ancora sconosciuti, legati alla patogenesi e all'epidemiologia delle micoplasmosi.

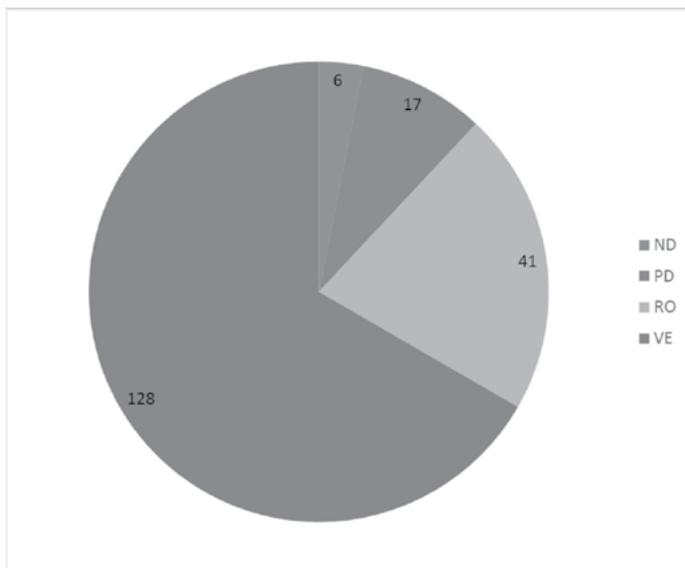
I risultati delle analisi di sequenziamento e di filogenesi potrebbero permettere di confermare tali dati preliminari, di evidenziare la presenza di nuove specie di micoplasmi o di specie filogeneticamente affini ai micoplasmi di pertinenza industriale/rurale. Inoltre i dati ottenuti potrebbero essere utili per implementare la metodica DGGE affinché possa essere fruibile anche per l'identificazione di *Mycoplasma spp.* nell'avifauna selvatica.

**Tabella 1.** Specie selvatiche analizzate e relativa positività.

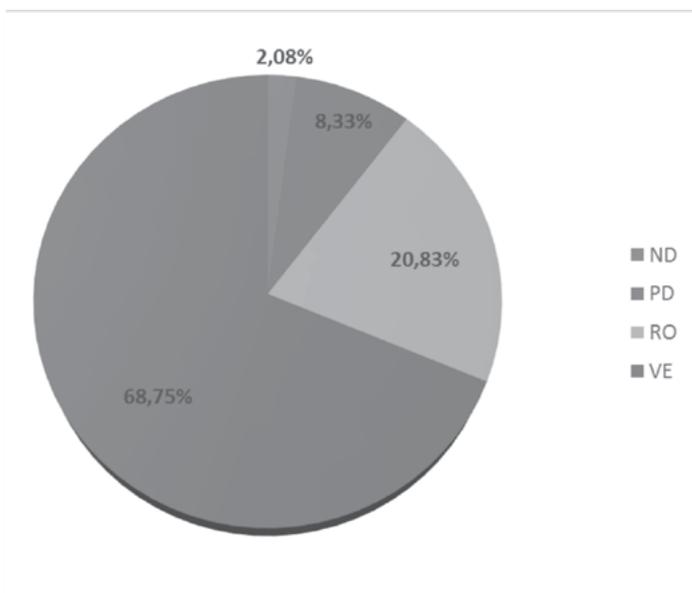
<b>Specie animale</b>	<b>Positivi/Totale</b>
<b>Airone cenerino</b> ( <i>Ardea cinerea</i> )	<b>0/3</b>
<b>Airone rosso</b> ( <i>Ardea purpurea</i> )	<b>0/1</b>
<b>Allocco</b> ( <i>Strix aluco</i> )	<b>0/2</b>
<b>Assiolo</b> ( <i>Otus scops</i> )	<b>0/1</b>
<b>Balestruccio</b> ( <i>Delichon urbica</i> )	<b>0/1</b>
<b>Barbagianni</b> ( <i>Tyto alba</i> )	<b>0/5</b>
<b>Beccaccia</b> ( <i>Scolopax rusticola</i> )	<b>0/5</b>
<b>Beccacino</b> ( <i>Gallinago gallinago</i> )	<b>0/1</b>
<b>Cigno reale</b> ( <i>Cygnus olor</i> )	<b>0/5</b>
<b>Civetta</b> ( <i>Athene noctua</i> )	<b>0/3</b>
<b>Colombaccio</b> ( <i>Columba palumbus</i> )	<b>1/1</b>
<b>Cormorano</b> ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	<b>1/2</b>
<b>Cornacchia grigia</b> ( <i>Corvus cornix</i> )	<b>0/3</b>
<b>Falco di palude</b> ( <i>Circus aeruginosus</i> )	<b>1/2</b>

<b>Falco pellegrino</b> (Falco peregrinus)	1/2
<b>Falco pescatore</b> (Pandion haliaetus)	0/2
<b>Frosone</b> (Coccothraustes coccothraustes)	0/1
<b>Gabbiano comune</b> (Chroicocephalus ridibundus)	1/6
<b>Gabbiano reale</b> (Larus michahellis)	13/25
<b>Gallinella</b> (Gallinula Chloropus)	0/3
<b>Garzetta</b> (Egretta garzetta)	0/3
<b>Gazza ladra</b> (Pica pica)	1/2
<b>Germano reale</b> (Anas platyrhynchos)	0/6
<b>Gheppio</b> (Falco tinnunculus)	7/16
<b>Ghiandaia</b> (Garrulus glandarius)	0/3
<b>Gufo comune</b> (Asio otus)	2/5
<b>Gufo di palude</b> (Asio flammeus)	0/1
<b>Merlo</b> (Turdus merula)	1/6
<b>Nitticora</b> (Nycticorax nycticorax)	1/1
<b>Oca</b> (Anser anser)	0/1
<b>Pettirosso</b> (Erithacus rubecula)	0/2
<b>picchio rosso mezzano</b> (Leiopicus medius)	0/1
<b>picchio verde</b> (Picus viridis)	0/3
<b>Piccione</b> (Columba livia)	1/6
<b>Poiana</b> (Buteo buteo)	8/23
<b>Porciglione</b> (Rallus aquaticus)	0/1
<b>Regolo</b> (Regulus regulus)	0/1
<b>Rondone</b> (Apus apus)	0/4
<b>Scricciolo</b> (Troglodytes troglodytes)	0/1
<b>Smeriglio</b> (Falco colombarius)	0/1
<b>Sparviere</b> (Accipiter nisus)	1/7
<b>Sterna</b> (Sterna)	0/2
<b>Strolaga minore</b> (Gavia stellata)	0/3
<b>Svasso maggiore</b> (Podiceps cristatus)	2/6
<b>Tarabusino</b> (Ixobrychus minutus)	0/2
<b>Tordo bottaccio</b> (Turdus phylomelos)	0/1
<b>Tortora dal collare</b> (Streptopelia decaocto)	5/8
<b>Tuffetto</b> (Podiceps ruficollis)	1/2

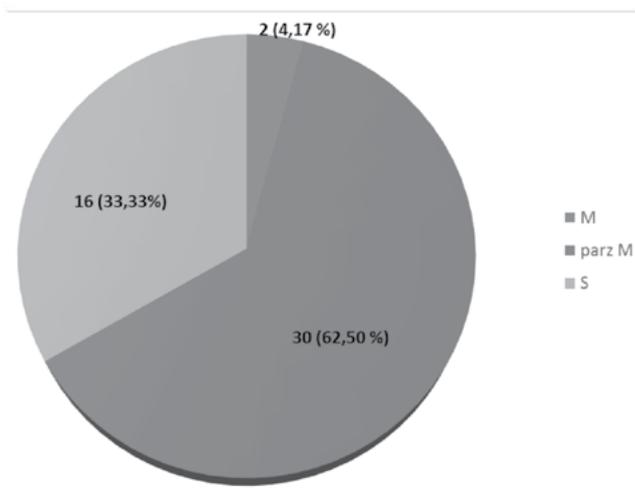
**Figura 1.** Distribuzione territoriale dei 192 campioni ad oggi analizzati.



**Figura 2.** Distribuzione territoriale dei 48 campioni risultati positivi (%).



**Figura 3.** Classificazione dei campioni risultati positivi in base al comportamento migratorio (blu), parzialmente migratorio (rosso) e stanziale (verde).



#### **BIBLIOGRAFIA**

1. O.I.E. Manual of Standards and Vaccines test 2008 - Chapter 2.3.5. - Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*)
2. McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J Med Microbiol.* 54:731-9.
3. Pennycott TW, Dare CM, Yavari CA, Bradbury JM (2005). *Mycoplasma sturni* and *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds in Scotland. *Vet Rec.* 156:513-515.
4. Lierz M, Hagen N, Hernandez-Divers SJ, Hafez HM. (2008). Occurrence of mycoplasmas in free-ranging birds of prey in Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 44:845-850.
5. Miles R and Nicholas R. *Methods in molecular biology* (1998). In: *Mycoplasma protocols*, Hymana Press, 104:145-165.



# IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DI *CAMPYLOBACTER* SPP. ISOLATI DA EPISODI DI EPATITE VIBRIONICA AVIARE (AVH) / SPOTTY LIVER DISEASE (SLD) DEL BROILER E DELLA GALLINA OVAIOLA

Piccirillo A.<sup>1</sup>, Zandonà L.<sup>2</sup>, Carraro L.<sup>1</sup>, Apostolakos I.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università degli Studi di Padova - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD).

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Treviso - Vicolo G. Mazzini, 4 - 31020 Villorba (TV).

## Summary

Thermophilic *Campylobacter* spp. are recognized as potential cause of Avian Vibriotic Hepatitis (AVH) and Spotty Liver Disease (SLD). In the first case, *C. jejuni* and *C. coli* have been identified as the main pathogens involved in the disease, whereas in the second one a new *Campylobacter* spp., namely *C. hepaticus*, has been isolated. In this paper, the results of a study aimed at identifying *Campylobacter* spp. involved in episodes of a disease resembling AVH/SLD are presented. Seventeen *Campylobacter* strains isolated from broilers and layer hens, affected by hepatic and splenic pathological lesions (*e.g.* focal necrosis, anomalous enlargement, modification of the Glisson's capsule), were identified by MALDI-TOF MS and conventional PCR. Out of 17 isolates, 11 were *C. jejuni* and six *C. coli*. In one sample from a layer hen, both *C. jejuni* and *C. coli* were isolated suggesting thus a co-infection. PCR targeting *C. hepaticus* gave negative results. These findings suggest that *C. jejuni* and *C. coli* may be the etiological agents of AVH/SLD cases occurring in commercial poultry in Italy. However, further studies are necessary to elucidate this hypothesis, namely whole genome sequencing will provide a better understanding of the genetic background, mainly the virulence factors, of these strains.

## INTRODUZIONE

*Campylobacter* termofili, in particolare *C. jejuni* e *C. coli*, sono batteri ben adattati alle specie aviari in cui colonizzano il tratto gastroenterico, frequentemente senza causare malattia (Zhang & Sahin, 2013). Tuttavia, *C. jejuni* è stato associato a casi di Epatite vibriónica aviare (AVH) già a partire dagli anni '50 ed anche *C. coli* è stato riportato quale possibile agente causale della malattia (Zhang & Sahin, 2013). Più recentemente, da casi di una malattia molto simile all'AVH, ma denominata *Spotty Liver Disease* (SLD), sono stati isolati ceppi di una nuova specie di *Campylobacter*, cui è stato assegnato il nome *C. hepaticus* (Van *et al.*, 2016). Nonostante gli agenti coinvolti siano differenti, alcuni Autori (Jennings *et al.*, 2011; Van *et al.*, 2017a) ritengono che si tratti della stessa malattia considerato che l'epidemiologia e le manifestazioni cliniche e patologiche sono molto simili. Oltre al Regno Unito (Crashaw & Young, 2003; Crawshaw *et al.*, 2015) e all'Australia (Grimes & Reece, 2011; Van *et al.*, 2017a), sia AVH che SLD sono state segnalate negli Stati Uniti, Canada, Nuova Zelanda, Estonia, Austria e Germania (Van *et al.*, 2017b). Mentre l'AVH viene segnalata sporadicamente (Zhang & Sahin, 2013), l'incidenza della SLD è aumentata considerevolmente negli ultimi

anni in Australia, e ciò è stato ricondotto all'ampia diffusione dell'allevamento *free-range* (Grimes & Reece, 2011; Jennings *et al.*, 2011). Infatti, entrambe le malattie possono colpire galline ovaiole e polli da carne in allevamento intensivo, ma la maggior parte dei focolai si verifica in allevamenti alternativi (*free-range* e rurali). La sintomatologia è aspecifica e consiste in mortalità acuta (fino al 10%) e calo dell'ovodeposizione. Le lesioni patologiche sono molto caratteristiche: epatite multifocale acuta con focolai di necrosi di 1-2 mm di diametro e di colore bianco-grigiastro (Crashaw & Young, 2003; Grimes & Reece, 2011). Nonostante sia stato confermato l'isolamento di *C. jejuni* e *C. coli* e *C. hepaticus* da casi di AVH e SLD rispettivamente, studi di infezione sperimentale hanno dimostrato che solo *C. hepaticus* è in grado di riprodurre la malattia (Crawshaw *et al.*, 2015; Van *et al.*, 2017a), mentre i tentativi fatti con *C. jejuni* e *C. coli* sono falliti (Jennings *et al.*, 2011). Dunque, ad oggi sembra essere confermato solo *C. hepaticus* quale agente eziologico della SLD, mentre rimane incertezza sul ruolo di *C. jejuni* e *C. coli* quali agenti causali dell'AVH.

Considerato dunque che ad oggi non si sa ancora con certezza se le due malattie siano riconducibili alla stessa condizione patologica e quale specie di *Campylobacter* sia coinvolta quale agente causale, l'obiettivo di questo studio è stato quello di approfondire le indagini diagnostiche su alcuni casi di malattia riconducibile ad AVH/SLD che hanno coinvolto polli da carne e galline ovaiole nel Nord Italia.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Fra il 2013 e il 2017, presso l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSve), Sezione di Treviso, sono stati isolati 17 di ceppi di *Campylobacter* spp. da episodi di malattia riconducibile ad AVH/SLD verificatisi in allevamenti commerciali di polli da carne e galline ovaiole (Tabella 1).

### *Isolamento di Campylobacter spp.*

L'isolamento dei ceppi di *Campylobacter* inclusi nello studio è avvenuto in conformità alla procedura riportata nel manuale OIE (2012) e che viene di seguito riassunta. Gli organi parenchimatosi con lesioni riconducibili a AVH/SLD sono stati cauterizzati superficialmente e parte dei tessuti profondi sono stati raccolti utilizzando una pipetta Pasteur in vetro sterile. Il campione è stato quindi introdotto in 9 mL di terreno liquido Preston (Biolife), successivamente incubato a 41,5 °C per 48 ore in condizioni di microaerofilia. Al termine dell'incubazione, 10 µL della brodocoltura d'arricchimento sono stati distribuiti per spatolamento sulla superficie del terreno selettivo agarizzato denominato CCDA (Biolife), successivamente posto per 48 ore in condizioni di microaerofilia a 41,5 °C. Ciascuna colonia morfologicamente riconducibile a *Campylobacter* spp. (grigia, piatta, traslucida, con riflessi metallici e tendenza a diffondere sulla superficie dell'agar) è stata trapiantata in 2 piastre di agar sangue (Oxoid) incubate a 37 ± 1°C. Una delle 2 piastre veniva incubata in condizioni di microaerofilia e l'altra in aerobiosi. Le colture microaerofile obbligate sono state quindi raccolte e sottoposte a colorazione di Gram. Le colonie ossidasi positive, costituite da batteri Gram negativi a forma di spirale o virgola, sono state sottoposte a identificazione tramite MALDI TOF MS e protocolli di biologia molecolare di seguito riportati.

#### *Identificazione di Campylobacter spp. tramite MALDI-TOF MS*

Dieci colonie isolate sono state sospese in 300 µl d'acqua ultrapura (W3500, Sigma-Aldrich) a cui venivano aggiunti 900 µl di etanolo. Dopo centrifugazione della sospensione batterica a 20.000 x g per 2 minuti, il *pellet* batterico è stato raccolto e risospeso in 20-50 µl di una soluzione acquosa di acido formico (70/30; vol/vol), a seconda delle dimensioni del *pellet*. E' stato quindi aggiunto pari volume di acetonitrile (Sigma-Aldrich) e la soluzione è stata centrifugata a 20.000 x g per 2 minuti. Successivamente 1 µl del sopranatante è stato trasferito sul supporto MALDI *target plate*, lasciato asciugare a temperatura ambiente e ricoperto con 1 µl di matrice. La matrice è costituita da una soluzione satura ottenuta dissolvendo 2,5 mg di acido *o*-ciano-4-idrossi-cinnamico (HCCA) (Sigma Aldrich) in una soluzione costituita da 500 µl di acetonitrile, 25 µl di acido trifluoroacetico (Bruker Daltonics) e 475 µl di acqua deionizzata.

Gli spettri venivano quindi acquisiti impiegando lo strumento MALDI *Biotyper Microflex* LT (Bruker Daltonics) ed elaborati attraverso il software MALDI *Biotyper* (versione 3.0). Lo strumento era stato precedentemente settato per ottenere spettri costituiti da componenti proteici di origine batterica con una massa compresa tra 1.960 e 20.137 Da. Per ciascun ceppo batterico analizzato lo spettro veniva ottenuto come risultante di 240 *laser shots* acquisiti in modalità automatica. Gli spettri ottenuti venivano poi comparati con quelli contenuti nel database di referenza del software V.3.1.2.0 (Bruker Daltonics), precedentemente implementato con lo spettro del ceppo di referenza di *C. hepaticus* *National Collection of Type Cultures* (NCTC) 13823.

#### *Identificazione di Campylobacter spp. mediante end-point e multiplex PCR*

Il DNA dei 17 ceppi di *Campylobacter* spp. è stato estratto utilizzando il metodo di lisi termica. Brevemente, una o due colonie venivano raccolte da una coltura fresca e sospese in 100 ml di acqua distillata sterile RNasi/DNasi-free (Sigma-Aldrich) e successivamente inattivate mediante bollitura per 20 minuti. I lisati cellulari venivano conservati a -20 °C fino all'esecuzione delle analisi. L'identificazione biomolecolare dei ceppi di *Campylobacter* a livello di genere e specie è stata eseguita mediante PCR multiplex seguendo la procedura descritta da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007), leggermente modificata. I *primer* sono stati selezionati tra quelli suggeriti dagli Autori per identificare simultaneamente il genere *Campylobacter* e le specie *C. jejuni* e *C. coli*. La reazione di amplificazione veniva eseguita utilizzando il *Qiagen Multiplex PCR Kit* (Qiagen), in un volume finale di 25 ml contenente 1 ml di DNA batterico, nel termociclatore 2720 (Applied Biosystems). I ceppi di referenza *C. jejuni* *American Type Culture Collection* (ATCC) 33560 e *C. coli* *Collection de l'Institut Pasteur* (CIP) 70.80 venivano usati come controlli positivi.

Allo stesso tempo, veniva eseguita anche un'*end-point* PCR per l'identificazione di *C. hepaticus* seguendo il protocollo descritto da Van *et al.* (2018), leggermente modificato. La reazione di amplificazione veniva eseguita utilizzando la *Dream Taq Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific), in un volume finale di 25 ml contenente 1 ml di DNA batterico, nel termociclatore 2720 (Applied Biosystems, Monza, Italy). Il ceppo di referenza *C. hepaticus* NCTC 13823 veniva usato come controllo positivo.

I prodotti di PCR venivano separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 3% in *Buffer* TBE 1X con l'aggiunta di 0.1 µl/ml (v/v) di *SybrSafe™ TM DNA Gel Stain* (Life Technologies). Le bande venivano visualizzate con il *Gel Doc™ XR* (BioRad).

## RISULTATI

Alla *multiplex* PCR, tutti i 17 ceppi sono stati confermati *Campylobacter* spp. di cui 11 *C. jejuni* e 6 *C. coli*. Da notare è la presenza contemporanea di *C. jejuni* e *C. coli* in uno stesso campione isolato da una gallina ovaioia (17/01/4401). Alla *end-point* PCR per l'identificazione di *C. hepaticus* tutti i ceppi testati sono risultati negativi.

La stessa identificazione è stata ottenuta anche attraverso MALDI TOF MS, ad eccezione del campione con coltura mista (17/01/4401) dove era stata individuata un'unica specie di *Campylobacter*.

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel presente studio dimostrano il coinvolgimento di *C. jejuni* e/o *C. coli* negli episodi di SLD e AVH verificatisi in allevamenti commerciali del pollo da carne e della gallina ovaioia. Sebbene la malattia non sia stata mai riprodotta sperimentalmente nel pollame impiegando *C. jejuni* e *C. coli*, la localizzazione in organi parenchimosi fa ritenere che questa consegua a una setticemia. Infatti, mentre la localizzazione epatica potrebbe essere ricondotta a una colonizzazione avvenuta attraverso il coledoco, quella splenica può trovare spiegazione solo con l'entrata in circolo del microrganismo.

Nelle realtà produttive in cui la malattia è ricorrente si adotta spesso la vaccinazione con stabulogeno allestito a partire da ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* isolati in corso di malattia. Tale approccio profilattico viene regolarmente ripetuto in gruppi di ovaiole e riproduttori allevati in strutture in cui la malattia si è presentata ripetutamente nei cicli precedenti, confermando l'utilità di un'azione profilattica nei confronti di queste due specie microbiche che, ad oggi, non sono state ancora messe in relazione con la malattia in modo inconfutabile.

Il prossimo passo sarà quello di caratterizzare geneticamente gli isolati sequenziando l'intero genoma (WGS). Il sequenziamento dell'intero genoma di questi *C. jejuni* e *C. coli* ci consentirà di studiarli approfonditamente da un punto di vista genetico e di valutare le relazioni genetiche e filogenetiche con ceppi di riferimento di *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hepaticus* e altri *Campylobacter*. Inoltre, il WGS consentirebbe di indagare l'eventuale esistenza di fattori genetici di virulenza comuni alle tre specie di *Campylobacter*. Le informazioni scaturite da questo studio ci consentiranno di chiarire il loro potenziale coinvolgimento e ruolo patogeno quali agenti eziologici dell'Epatite vibriónica aviare/*Spotty Liver Disease*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Crawshaw T, and Young S. (2003). Increased mortality on a free-range layer site. *Vet. Rec.* 153: 664.
2. Crawshaw TR, Chanter JI, Young SC, Cawthraw S, Whatmore AM, Koylass MS, Vidal AB, Salguero FJ, and Irvine RM. (2015). Isolation of a novel thermophilic *Campylobacter* from cases of spotty liver disease in laying hens

- and experimental reproduction of infection and microscopic pathology. *Vet. Microbiol.* 179: 315-321.
3. Grimes T, and Reece R. (2011). Spotty liver disease-an emerging disease in free-range layers in Australia. 60th Western Poultry Disease Conference.
  4. Jennings JL, Sait LC, Perrett CA, Foster C, Williams LK, Humphrey TJ, Cogan TA. (2011). *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. *Vet. Microbiol.* 149: 193-199.
  5. Van TT, Elshagmani E, Gor MC, Scott PC, Moore RJ. (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 4518-4524.
  6. Van TT, Elshagmani E, Gor MC, Anwar A, Scott PC, Moore RJ. (2017a). Induction of spotty liver disease in layer hens by infection with *Campylobacter hepaticus*. *Vet. Microbiol.* 199: 85-90.
  7. Van TTH, Gor MC, Anwar A, Scott PC, Moore RJ. (2017b). *Campylobacter hepaticus*, the cause of spotty liver disease in chickens, is present throughout the small intestine and caeca of infected birds. *Vet. Microbiol.* 207: 226-230.
  8. Van TTH, Anwar A, Scott PC, Moore RJ. (2018). Rapid and specific methods to differentiate foodborne pathogens, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and the new species causing spotty liver disease in chickens, *Campylobacter hepaticus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 22.
  9. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N, Tsukamoto T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 56: 1467-1473.
  10. Zhang Q, and O Sahin. (2013). Campylobacteriosis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Suarez DL, Nair V (Eds.), *Diseases of Poultry*, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 737-750.
  11. OIE (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* - chapter 2.9.3

**Tabella 1.** Ceppi di *Campylobacter* spp. isolati da episodi di malattia in polli da carne e galline ovaiole, fra il 2013 e il 2017.

Riferimento ceppo	<i>Campylobacter</i> spp.	Specie	Organo	Lesioni A/P
13/02/2766	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Epatite necrotica e focolai disseminati dalle dimensioni di 0,5-1mm
14/06/7281	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Periepatite con ispessimento e aspetto traslucido della glissoniana. Splenomegalia
14/02/7704	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Epato-splenomegalia
14/03/8141	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Necrosi epatiche miliare disseminate
9263/14	<i>C. jejuni</i>	Cappone	Fegato	Epatomegalia e splenomegalia caratterizzate da multifocali formazioni nodulari di aspetto biancastro che si approfondano nel parenchima
16/03/2264	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Epatite con foci necrotici multipli disseminati su tutto il parenchima
8728/16	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Periepatite con aspetto traslucido della glissoniana che si presenta parzialmente distaccata
17/02/2351	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Steatosi epatica con inspessimento e opacizzazione della glissoniana
4572/17	<i>C. jejuni</i>	Pollo da carne	Fegato	Lieve epatomegalia. Flebili necrosi epatiche sulla superficie dell'organo
17/03/5476	<i>C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Flebili necrosi epatiche disseminate. Splenomegalia
17/01/4401	<i>C. coli - C. jejuni</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Epato-splenomegalia. Glissoniana ispessita e traslucida
14/01/4211	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Rottura epatica. Fegato pallido e friabile
14/01/7281	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Periepatite con ispessimento e aspetto traslucido della glissoniana. Splenomegalia
14/02/7921	<i>C. coli</i>	Pollo da carne	Milza	Epato-splenomegalia
11444/5/14	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Inspessimento e aspetto traslucido della glissoniana; pericardite fibrinosa
8760/15	<i>C. coli</i>	Gallina ovaiole	Fegato	Epato-splenomegalia

## EVIDENZA DI CIRCOLAZIONE DI METAPNUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO C IN UN FISCHIONE (*ANAS PENOLOPE*) CAMPIONATO IN NORD ITALIA

Silveira F.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Tucciarone C.M.<sup>2</sup>, Mescolini G.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Martini M.<sup>2</sup>, Terregino C.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) - Italia.

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

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD), Padova - Italia

### Summary

Avian metapneumovirus (aMPV) is classified into 4 subtypes (A, B, C and D) and causes respiratory disorders in turkeys and chickens. In this work we report a detection of an aMPV subtype C (aMVP-C) in a wild bird sampled in Italy. Tracheal swabs were collected from 492 live wild birds sampled in Northeastern Italy. RNA was extracted and tested for the presence of aMPV through a one-step Real Time RT-PCR protocol able to detect and distinguish all known subtypes. From a young male Eurasian wigeon (*Anas penelope*) an aMPV strain of subtype C was detected. In order to characterize the detected strain, named aMPV/C/IT/Wigeon/758-53/07, the Matrix (M) gene was amplified and sequenced. Sequences were aligned with homologous aMPV subtype C sequences retrieved from *GenBank*, and analyzed. The strain showed the highest similarity with an aMPV-C isolated from a Muscovy duck in France in 1998. This is the first report of aMPV from a wild bird sampled in Italy.

### INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus aviare* (aMPV) è un virus RNA, appartenente alla famiglia *Paramyxoviridae*, sottofamiglia *Pneumovirinae*, che nel tacchino è l'agente eziologico della Rinotracheite del tacchino (TRT) e nel pollo causa forme respiratorie che possono esitare nella Sindrome della testa gonfia (Cecchinato, 2016).

L'aMPV è classificato in 4 sottotipi (A, B, C e D) in base ai profili genetici e antigenici. Dalla sua prima segnalazione in Sudafrica nel 1978 (Buys *et al.*, 1989) aMPV si è diffuso in tutto il mondo ad esclusione dell'Oceania. In Italia, gli unici sottotipi evidenziati nel pollame domestico sono aMPV-A e aMPV-B, con quasi esclusiva prevalenza, negli ultimi anni, di quest'ultimo sottotipo.

Il sottotipo C è stato segnalato per la prima volta in tacchini in USA (Seal, 1998), quindi in anatre mute in Francia (Toquin *et al.*, 1999, Toquin *et al.*, 2006), in fagiani in Corea del sud (Lee *et al.*, 2007) ed in polli (Wei *et al.*, 2013) ed anatre mute (Sun *et al.*, 2014) in Cina.

aMPV sottotipo C è stato evidenziato anche in varie specie di uccelli selvatici in Nord America (Turpin *et al.*, 2008, Jardine *et al.*, 2018) ed Europa (Boheemen *et al.*, 2012) supportando l'ipotesi che gli uccelli selvatici possano giocare un ruolo come serbatoi di aMPV per il pollame (Cecchinato *et al.*, 2016).

Nel presente studio è riportato il riscontro, e l'analisi molecolare, di un ceppo di aMPV sottotipo C in un Fischione (*Anas penelope*) campionato in Nord Italia nel 2007.

## **MATERIALE E METODI**

### *Campionamento*

Sono stati analizzati 492 campioni ottenuti da uccelli selvatici appartenenti ai seguenti ordini: anseriformi (*Anas crecca*, n. 30; *Anas strepera*, n.13; *Anas acuta*, n.6; *Anas penelope*, n.80; *Anas platyrhynchos*, n. 84; *Anas querquedula*, n.18; *Anas clypeata*, n.13; *Aythya ferina*, n. 21), caradriformi (*Larus michahellis*, n. 96) e passeriformi (*Sylvia atricapilla*, n. 9; *Carduelis carduelis*, n. 1; *Parus major*, n. 15; *Fringilla coelebs*, n. 4; *Turdus merula*, n. 13; *Alcedo atthis*, n. 1; *Prunella modularis*, n. 8; *Erithacus rubecula*, n. 27; *Troglodytes troglodytes*, n. 1; *Turdus philomelos*, n. 36; *Turdus iliacus*, n. 2; *Cettia cetti*, n. 1; *Carduelis chloris*, n. 1; non identificati, n. 12), nell'ambito del programma di sorveglianza attiva nei riguardi dei virus dell'influenza aviaria negli uccelli selvatici, eseguito dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS) nel periodo 2007-2010, nelle regioni Veneto, Lombardia ed Emilia-Romagna. I campioni erano costituiti da tamponi tracheali conservati a -80° C fino a processazione.

### *Estrazione del RNA, qRT-PCR e RT-PCR*

I campioni sono stati processati inizialmente in pool da 5, a seconda dell'Ordine di appartenenza, successivamente, in caso di positività, è stato ripetuto l'esame in singolo.

I tamponi sono stati stemperati in PBS, quindi sottoposti ad estrazione di RNA virale secondo il metodo di Jing *et al.* (1993) che prevede l'utilizzo di Guanidina Tiocianato.

Ogni estratto era quindi testato mediante un protocollo di real-time RT-PCR (qRT-PCR) disegnato sul gene N (nucleocapside) in grado di identificare, distinguere e quantificare simultaneamente i sottotipi A, B, C e D (Lemaitre *et al.*, 2018). La reazione è stata eseguita, in doppio utilizzando il kit qRT-PCR SuperScript™ III Platinum™ SYBR™ Green One-Step (Invitrogen). In caso di positività per aMPV si è proceduto all'amplificazione del gene M secondo il protocollo di Seal (1998).

### *Sequenziamento e analisi filogenetica*

Il gene M è stato sequenziato, in entrambe le direzioni, presso il centro di sequenziamento Macrogen Europe (Madrid). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit, allineate e confrontate, alle sequenze omologhe di ceppi aMPV-C presenti in *GenBank* utilizzando il software Clustal W. L'analisi filogenetica è stata realizzata utilizzando l'algoritmo Neighbor-Joining con il software MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013). Sono stati considerati attendibili solo i nodi dell'albero filogenetico con valori di bootstrap pari o maggiori di 70, calcolati su 1000 replicati.

## **RISULTATI e DISCUSSIONI**

Da un giovane Fischione (*Anas penelope*), maschio, campionato nel 2007 in Valle Chiusa, Parco Regionale del Delta del Po', Rovigo (Veneto), è stato evidenziato un ceppo di aMPV sottotipo C, denominato aMPV/C/IT/Wigeon/758-53/07. Si tratta

della prima segnalazione di circolazione di aMPV sottotipo C in un anatide selvatico svernante nel nostro paese, dove tra l'altro, il sottotipo C non è stato mai segnalato nel pollame domestico.

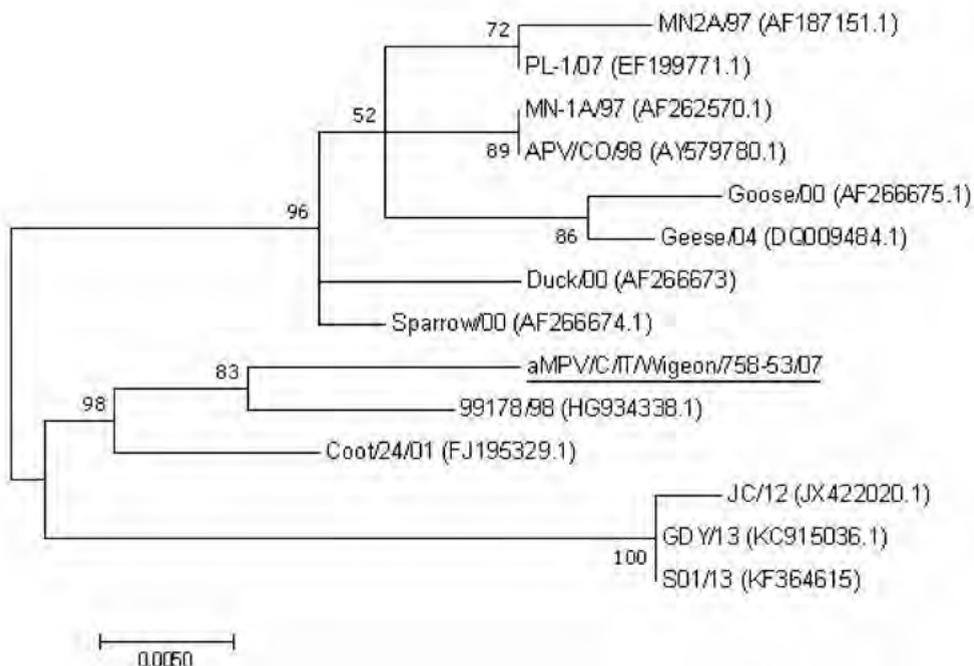
All'allineamento delle sequenze nucleotidiche (nt) ed amminoacidiche (aa) del gene M del ceppo aMPV/C/IT/Wigeon/758-53/07, con sequenze omologhe disponibili in *GenBank*, è stata evidenziata la maggiore similarità (98,2% nt; 94,8% aa) con il ceppo aMPV/C/FR/Muscovyduck/99178/98 isolato da Anatre mute in Francia, nel 1998 (Toquin *et al.*, 1999, Toquin *et al.*, 2006) (Tabella 1 e Figura 1), rispetto ai ceppo aMPV-C isolati in USA da Tacchini (Seal, 1998) o in Corea da fagiano (Lee *et al.*, 2007).

Questo dato da un lato supporta la possibile specificità degli aMPV-C circolanti negli anatidi rispetto a quelli circolanti in altre specie, come già evidenziata da Brown *et al.* (2014); dall'altro, il dato è d'interesse epidemiologico e pone un allarme sul potenziale ruolo degli anatidi selvatici come serbatoi di aMPV-C aumentando il rischio d'introduzione nelle popolazioni di anatidi domestici come ci insegnano le dinamiche di diffusione dei virus influenzali. A conferma di queste ipotesi sarà necessario continuare l'indagine epidemiologica su aMPV-C nei selvatici, ampliarla al pollame domestico e rafforzare l'analisi molecolare sequenziando altri tratti del genoma del ceppo aMPV/C/IT/Wigeon/758-53/07.

**Tabella 1:** Percentuale di similarità nucleotidica (nt) e amminoacidica (aa) nel gene M tra il ceppo aMPV/C/IT/Wigeon/758-53/07 e le sequenze omologhe, con maggiore similarità, disponibili in *GenBank*.

Ceppo	Specie	Paese	Anno	Ac. Number	Gene M	
					nt	aa
99178/98	Anatra	Francia	1999	HG934338.1	98,2	94,8
Coot/24	Folaga	USA	2001	FJ195329.1	97,7	94,0
Sparrow	Passero	USA	2000	AF266674.1	97,0	92,3
PL-1	Fagiano	Sud Corea	2007	EF199771.1	96,5	89,8
Duck	Anatra	USA	2000	AF266673	96,5	89,9
APV/CO	Tacchino	USA	1997	AY579780.1	96,5	89,8
MN-1A	Tacchino	USA	1997	AF262570.1	96,5	89,8
Goose	Oca	USA	2000	AF266675.1	96,2	88,9
GDY	Anatra	Cina	2013	KC915036.1	96,2	88,8
S01	Anatra	Cina	2013	KF364615	96,2	88,8
Geese	Oca	USA	2004	DQ009484.1	96,0	88,9
MN2A	Tacchino	USA	1997	AF187151.1	96,0	88,2
JC	Pollo	Cina	2012	JX422020.1	96,0	88,0

nt=nucleotidi, aa=amminoacidi



**Figura 1.** Albero filogenetico relativo alle sequenze del gene M del ceppo aMPV/C/IT/Wigeon/758-53/07 e di aMPV sottotipo C presenti in *GenBank*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Brown PA, Lemaitre E, Briand FX, Courtillon C, Guionie O, Allée C, Toquin D, Bayon-Auboyer MH, Jestin V and Etteradossi N. (2014). Molecular Comparisons of Full Length Metapneumovirus (MPV) Genomes, Including Newly Determined French AMPV-C and -D Isolates, Further Supports Possible Subclassification within the MPV Genus. *PLoS ONE*, 9, e102740.
2. Buys SB, du Preez JH and Els HJ. (1989). The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 56, 87–98.
3. Cecchinato M, Ferreira HL, Munir M, *et al.* (2016). Avian Metapneumovirus. In: *Mononegaviruses of Veterinary Importance: Molecular Epidemiology and Control*. CAB International: Lancaster, UK, p:216.
4. Jardine CM, Parmley EJ, Buchanan T, Nituch L and Ojkic D. (2018). Avian metapneumovirus subtype C in Wild Waterfowl in Ontario, Canada. *Transbound. Emerg. Dis.* DOI: 10.1111/tbed.12832 (ahead of print).
5. Jing L, Cook JKA, David T, Brown K, Shaw K and Cavanagh D. (1993). Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 22, 771–783.

6. Lemaitre E, Allée C, Vabret A, Etteradossi N and Brown P. (2018). Single reaction, real time RT-PCR detection of all known avian and human metapneumoviruses. *J. Virol. Methods* 251, 61–68
7. Lee EH, Song MS, Shin JY, *et al.* (2007). Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market. *Virus Res.* 128, 18–25.
8. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
9. Toquin D, Bâyon-Auboyer MH, Etteradossi N, Jestin V and Morin H. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet. Rec.* 145, 680.
10. Toquin D, Guionie O, Jestin V, Zwingelstein F, Allee C. and Etteradossi N. (2006). European and American Subgroup C Isolates of Avian Metapneumovirus belong to Different Genetic Lineages. *Virus Genes*, 32, 97–103.
11. Turpin EA, Stallknecht DE, Slemons RD, Zsak L and Swayne DE. (2008). Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathol.* 37, 343–351.
12. Seal BS. (1998). Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. -*Virus Research*, 58, 45–52.
13. Sun S, Chen F, Cao S, Liu J, Lei W, Li G, Song Y, Lu J, Liu C, Qin J. and Li H. (2014). Isolation and characterization of a subtype C avian metapneumovirus circulating in Muscovy ducks in China. *Veterinary Research*, 45, 74–74.
14. van Boheemen S, Bestebroer TM, Verhagen JH, Osterhaus ADME, Pas SD, Herfst S and Fouchier RAM. (2012). A Family-Wide RT-PCR Assay for Detection of Paramyxoviruses and Application to a Large-Scale Surveillance Study. *PLOS ONE*, 7, e34961.
15. Wei L, Zhu S, Yan X, Wang J, *et al.* (2013). Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1092–1094.



## MICOBATTERIOSI AVIARE: QUADRI ANATOMO-PATOLOGICI A CONFRONTO

Tonellato F. R.<sup>1</sup>, Moronato M.L.<sup>1</sup>, Zanardello C.<sup>2</sup>, Sturaro A.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>3</sup>, Gobbo F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1- Laboratorio di Medicina Aviare, U.O. Micoplasmici- Legnaro (PD);

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS3- Laboratorio di Istopatologia- Legnaro (PD);

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1- Laboratorio di Medicina Aviare, Verona

### Summary

*Avian mycobacteriosis is a chronic infectious disease affecting all bird species. During the years 2011-2016, 17 cases of avian mycobacteriosis have been diagnosed by our laboratory in different aviary species. At necropsy, three different Gross pathology presentations of avian mycobacteriosis have been identified: tubercular, paratubercular and atypical mycobacteriosis. If the tubercular and paratubercular forms are easily detectable in poultry and free-ranging species, atypical mycobacteriosis mainly affects pet birds and may be underestimated for the absence of tubercular lesions at necropsy and by animals reduced size. This study reports interesting Gross-pathology findings in pet birds in case of mycobacteriosis, like the constant presence of tiny and nodular, lardaceous lesions in canaries (*Serinus canaria*) and the “Tiger-striped lung,” in goldfinches (*Carduelis carduelis*).*

*Findings of avian mycobacteriosis in synanthropic species like pet birds must be considered from a public health point of view: *M. genavense*, described as the principal agent of avian mycobacteriosis in these species, is actually a full-blown agent of infections in immunocompromised humans. Based on previous considerations, intra-vitam diagnosis needs to be implemented in pet birds, for example through the application of novel biomolecular techniques.*

*In the meanwhile, prevention should be considered as a milestone in ornamental birds and veterinarians should promote and support educational measures with owners and retailers.*

### INTRODUZIONE

La micobatteriosi è una malattia ad andamento cronico e depauperante sostenuta negli uccelli principalmente da *Mycobacterium avium subsp. avium* (sierotipi 1,2,3) e *Mycobacterium intracellulare*, inclusi insieme nel *Mycobacterium Avium – Intracellulare Complex* -MAI-).

Circa un'altra ventina di micobatteri sono stati individuati nel corso degli anni come responsabili di micobatteriosi aviare, e tra questi *Mycobacterium genavense* desta sempre più interesse nel comparto degli uccelli da compagnia/ornamentali (*pet birds*). Tutte le specie aviari sono suscettibili all'infezione, sviluppando quadri clinici comuni quali progressivo dimagrimento e consunzione (*chronic wasting syndrome*), abbattimento, letargia ed immunosoppressione. I quadri anatomopatologici riferibili a tubercolosi possono invece differenziarsi in funzione della specie batterica coinvolta, la specie animale e la via di infezione. Si possono infatti definire tre principali

manifestazioni anatomico-patologiche: una forma classica tubercolare (simile alla tubercolosi dei mammiferi), una para-tubercolare ed una atipica.

I micobatteri del complesso MAI sono descritti in letteratura come principali agenti di micobatteriosi nelle specie ad attitudine terricola, quali il pollame e gli animali da cortile, che sviluppano forme tubercolari o para-tubercolari della malattia. La localizzazione prevalentemente a livello gastroenterico in questi animali può essere imputabile al loro stretto contatto con il suolo, al loro comportamento alimentare, e alla via di trasmissione oro-fecale di micobatteri quali *M. avium subsp. avium* ed *M. intracellulare*, altamente resistenti nel terreno. La presenza di tubercoli in altre sedi (come per esempio l'apparato respiratorio) suggerisce inoltre la possibile infezione per via respiratoria, condizione compatibile anche con elevate cariche di micobatteri a livello ambientale.

La micobatteriosi atipica viene definita così proprio per l'assenza di lesioni tubercolari macroscopicamente evidenti a carico di organi interni, tale quadro risulta il predominante nel settore ornamentale e *M. genavense* è stato descritto come il micobatterio prevalente nei passeriformi da voliera.

Considerando l'assenza di lesioni macroscopiche e le piccole dimensioni corporee di alcune di queste specie ornamentali, è presumibile che la micobatteriosi in questo settore sia sottostimata. Inoltre considerando i *pet birds* come specie sinantropiche il potenziale zoonotico delle micobatteriosi aviare non va sottovalutato, poiché membri del complesso MAI e *M. genavense* sono stati riportati come agenti capaci di indurre malattia in persone immunodepresse (anziani, persone HIV-sieropositive o sottoposte a chemioterapia o trapianto).

Lo scopo del presente lavoro è quello di condividere la presentazione anatomopatologica di diversi casi di TBC aviare (2011-2016) nella sue diverse tre forme e nello specifico di riportare importanti rilievi patologici nel settore ornamentale *in primis* nel cardellino (*Carduelis carduelis*) e poi nel canarino (*Serinus canaria*) dove la forma atipica è la predominante, cercando di fornire "un segna passi" al clinico e al patologo per l'inclusione della tubercolosi/micobatteriosi nella lista della Diagnosi Differenziale.

## **MATERIALI E METODI**

Le carcasse di specie aviari inviate al Laboratorio di Medicina Aviare dell'IZSVE e destinate ad esame autoptico vengono sottoposte a specifici *panels di tests* diagnostici definiti in base alla specie, alla categoria produttiva, all'età e alla sindrome riscontrata in sede autoptica. Alla necropsopia della carcassa seguono esami ad ampio spettro includendo indagini parassitologiche, microbiologiche, virologiche, istopatologiche, etc. etc.

Nello specifico in caso di lesioni macroscopiche di aspetto tubercolare o comunque di sospetto di micobatteriosi aviare, porzioni degli organi affetti vengono fissate in formalina 10% ed inviate al Laboratorio SCS3 di Istopatologia per approfondimenti diagnostici.

Qual ora la sezione di tessuto (E-E) evidenzi quadri microscopici compatibili o sospetti di micobatteriosi aviare, il laboratorio procede in un secondo tempo all'esame istochimico tramite colorazione di Ziehl-Neelsen (Z-N), considerata un *golden standard* per la diagnosi di tubercolosi poiché consente di evidenziare i micobatteri come bacilli acido-resistenti di colore rosso.

## RISULTATI

Durante gli anni 2011-2016, gli animali risultati positivi a micobatteriosi sono stati in tutto 17, pari a 1/273 (0,36%) pappagalli (*Amazona autumnalis*), 3/2.320 (0,12%) polli (*Gallus gallus*), 1/533 (0,18%) tacchino (*Meleagris gallopavo*), 5/96 (5,20%) cardellini (*Carduelis carduelis*), 2/209 (0,95%) passeriformi, nello specifico un ciuffolotto (*Pyrrhula pyrrhula*) e un organetto (*Acanthis flammea*), 1/583 (0,17%) canarini (*Serinus canaria*), 1/170 (0,58%) germano reale (*Anas platyrhynchos*) e 3/12 (25%) gru (*Grus carunculata*, *Balearica regulorum*).

L'esame autoptico ha rilevato in tutti i soggetti un grave stato di emaciazione, caratterizzato da marcata prominenza sternale, grave atrofia dei muscoli pettorali e totale assenza di grasso a livello periviscerale. Imbrattamento della regione pericloacale e scadente qualità del piumaggio sono altri segni riportati frequentemente. A seconda delle specie aviare coinvolta, tuttavia, i rilievi anatomopatologici sono stati differenti.

Nei polli affetti da micobatteriosi, lesioni tubercolari di aspetto tipico sono state evidenziate esclusivamente a livello di apparato gastroenterico, milza e fegato compresi (forma paratubercolare). Questi organi, oltre ad essere aumentati notevolmente di dimensioni, manifestavano una completa alterazione dell'architettura per la presenza di diffusi tubercoli di colorito *beige*-giallastro di dimensioni estremamente variabili infiltranti i parenchimi. L'intestino presentava inoltre pareti ispessite soprattutto a livello prossimale, contenuto luminale liquido ed eventuali tubercoli prominenti il lume. L'esecuzione di approfondimenti istopatologici (E-E) da campioni di fegato, milza ed intestino ha evidenziato in tutti gli organi lesioni nodulari multiple di aspetto granulomatoso, caratterizzate da un centro necrotico circondato da macrofagi epitelioidi e cellule giganti multinucleate. L'esame istochimico (Z-N) ha indicato la presenza di batteri acido-resistenti riferibili a *Mycobacterium spp.* nel citoplasma di macrofagi e cellule giganti multinucleate.

Nelle specie quali tacchino, gru e germano reale le lesioni tubercolari si estendevano a più apparati, coinvolgendo anche il sistema respiratorio e nello specifico il parenchima polmonare (forma tubercolare); nelle gru degno di nota è il riscontro di lesioni caratteristiche anche a carico dei sacchi aerei, oltre che a livello del parenchima renale e timico. L'esame istologico in queste specie è stato eseguito a partire da campioni di milza, fegato e polmone evidenziando in quest'ultimo caso la presenza di una polmonite/broncopolmonite granulomatosa associata alla presenza di bacilli acido-resistenti. Nel caso delle gru positive, sono stati effettuati ulteriori approfondimenti biomolecolari (RFLP-PCR) che hanno consentito di identificare *Mycobacterium avium subsp. avium* come l'agente responsabile del quadro tubercolare.

Negli uccelli ornamentali, o *pets* (canarino, cardellino, organetto, ciuffolotto e pappagallo) raramente è stato possibile evidenziare la presenza di lesioni macroscopiche a livello viscerale (forma atipica), ad eccezione del canarino (*Serinus canaria*) nel quale sono state riportate piccole neoformazioni di aspetto nodulare e peduncolate a carico della parete degli stomaci ghiandolare e/o muscolare, in prossimità dell'apparato gastroenterico e dell'apparato riproduttore. Tali neoformazioni nella maggior parte dei casi si presentavano non capsulate e di aspetto simil-lardaceo alla superficie di taglio; inoltre in tutti gli uccelli da voliera risultati positivi a micobatteriosi si notava epato-splenomegalia (associata in

alcuni casi a pallore, in altri a congestione dei parenchimi) ed enterite catarrale. Nel cardellino (*Carduelis carduelis*) peculiare è stato il costante riscontro di cianosi del becco ed un *pattern* polmonare caratteristico a carico della porzione dorsale dell'organo: "Tiger-striped lung" caratterizzato da aree di congestione/emorragia polmonare alternate ad aree di pallore del parenchima, tali da conferire all'organo un aspetto tigrato. Il medesimo *pattern* è stato confermato in sede microscopica, con aree di infiltrazione macrofagica del parenchima polmonare alternate ad aree di emorragia e con presenza di bacilli acido-resistenti in sede macrofagica. Tutti gli animali appartenenti alla specie cardellino risultati positivi condividevano una anamnesi clinica di depauperamento cronico e progressivo, emaciazione, recidiva alle infezioni con scarsa risposta alle terapie farmacologiche.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

L'applicazione di specifici protocolli diagnostici ha permesso di confermare la presenza di micobatteri negli avicoli rurali e negli animali da compagnia, e al contrario di escluderne la presenza nel settore avicolo industriale, dove tale malattia può considerarsi eradicata soprattutto in funzione del lungo periodo d'incubazione, delle moderne tempistiche di allevamento e delle misure di biosicurezza applicate.

Nei 17 casi di infezione da *Mycobacterium spp.* (2011-2016) è stato possibile discriminare i tre principali quadri anatomopatologici di tubercolosi riportati in letteratura: la forma tubercolare, para-tubercolare, ed in fine negli uccelli ornamentali quella atipica. In quest'ultimi, e nello specifico nel cardellino e canarino, si sono rilevati dei quadri anatomopatologici piuttosto frequenti e specifici, che dovrebbero indirizzare il patologo alla inclusione della tubercolosi/micobatteriosi aviare nella lista della Diagnosi differenziale.

L'evidenza di elevate positività nel settore ornamentale e quindi in uccelli sinantropi, fa emergere la necessità di approfondire le conoscenze anche in queste specie animali non convenzionali, delucidando la/le specie di micobatteri coinvolti, la patogenesi della malattia e il loro possibile ruolo zoonotico. Ne consegue che le metodiche biomolecolari ad oggi disponibili dovrebbero essere implementate per essere fruibili anche per la diagnosi *intra vitam* di specie animali ornamentali di piccolissime dimensioni (come fringillidi e passeriformi) in cui esame clinico e manipolazione non sono sempre eseguibili.

Allo stato attuale, ed in attesa dunque di una futura evoluzione delle metodiche diagnostiche, la prevenzione acquisisce un ruolo ancor più essenziale: il veterinario in questo contesto dovrebbe promuovere azioni di divulgazione e formazione a proprietari, collezionisti e rivenditori in merito ad aspetti sanitari e di biosicurezza.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. TELL LA, WOODS L, CROMIE RL. Mycobacteriosis in birds. *Rev Sci Tech* 2001;20(1):180-203
2. MANAROLLA G, LIANDRIS E, PISONI G, et al. Avian Mycobacteriosis in Companion Birds: 20-Year Survey. *Vet Microbiol* 2009;133:323-27
3. SHIVAPRASAD H L, PALMIERI C. Pathology of mycobacteriosis in birds. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2012;15(1):41-55
4. DHAMA K, MAHENDRAN M, TIWARI R, et al. Tuberculosis in Birds: Insights into the Mycobacterium avium Infections. *Vet Med Int* 2011;712369

5. MILTON F, FRANSON C., TECHNICAL EDITORS. Tuberculosis. In: Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds. Washington, D.C. :U.S. Dept. of the Interior, U.S. Geological Survey :,1999:93-8
6. MADANI SA, HADDAD-MARANDI MR, ARABKHAZAELI F. Concurrent atypical diffused tuberculosis and macrorhabdosis in a canary (*Serinus canaria*). *Vet Res Forum* 2015;6(1):89-93.
7. OIE. Avian Tuberculosis. *OIE Terrestrial manual 2014*;chapter 2.3.6
8. SLANY M, ULMANN V, SLANA I. Avian Mycobacteriosis: Still Existing Threat to Humans. *BioMed Res Int* 2016;4387461.
9. SCHRENZEL MD. Molecular epidemiology of Mycobacteriosis in Wildlife and pet animals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2012;15(1):1-23
10. COUSINS DV, WHITTINGTON R, MARSH I, et al. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from the faeces of ruminants possess IS 900 -like sequences detectable by IS 900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes* 1999;13:431-42
11. TELL LA, FOLEY J, NEEDHAM ML, et al. Diagnosis of avian mycobacteriosis: comparison of culture, acid fast-stains and polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium avium* in experimental inoculated japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian Dis* 2003;47(2):444-52
12. SCHMITZ A, KORBEL R, THIEL S, et al. High prevalence of *Mycobacterium genavense* within flocks of pet birds. *Vet Microbiol* 2018;218:40-44



## **CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA *EIMERIA TENELLA*, *EIMERIA MAXIMA* ED *EIMERIA ACERVULINA* IN POLLI DA CARNE MEDIANTE L'IMPIEGO DI UN'ASSOCIAZIONE TRIMETOPRIM+SULFADIMETOSINA (RAPPORTO 1:5)**

Tosi G.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Parigi M.<sup>1</sup>, Fregnani G.<sup>1</sup>, Benedetti V.<sup>2</sup>, Leotti G.<sup>2</sup>, Ostanello F.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione Diagnostica di Forlì – Via Don Eugenio Servadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC)

<sup>2</sup>Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.a. – Via Lorenzini 8, Milano (MI)

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna - Via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO)

### **Summary**

A clinical study was conducted to determine the efficacy of an association of trimethoprim and sulfadimethoxine (ratio 1:5) in controlling coccidiosis in broiler chickens. Five groups of 20 broilers (raised in poultry isolators) were orally infected, at 21 days of age, with 1mL of a suspension containing 5000 sporulated oocysts of *Eimeria tenella*, 5000 sporulated oocysts of *Eimeria maxima* and 10000 sporulated oocysts of *Eimeria acervulina*. The treatment (in the drinking water) started at the beginning of the mortality. Different therapeutic schemes were tested: 0.5 mL/L for 5 consecutive days (group “B”); 1 mL/L for the first day followed by 0.5 mL/L over the next 4 days (group “C”); 1 mL/L for 5 consecutive days (group “D”); 2 mL/L for the first day followed by 1 mL/L over the next 4 days (group “E”); infected and not treated group (group “A”). Clinical signs appeared 6 days post-infection and mortality due to coccidiosis beginning 14 days post-infection in all groups and continued in the following two days in the control group only. Mortality and intestinal lesion score were significantly less ( $p < 0.001$ ) in all treated groups compared to the control group. No significant differences in terms of efficacy were noted between group “B” and group “C” and between groups with constant dosage (groups B and D) and groups with variable dosage (groups C and E). The proportion of animals without intestinal lesions (score “0”) showing “moderate” (score 1 and 2) and “severe” lesions (score 3 and 4) was significant different ( $p < 0.001$ ) in the different groups with a greater prevalence of “moderate” and “severe” lesions in the control group.

### **INTRODUZIONE**

La coccidiosi è tuttora considerata tra le patologie economicamente più importanti del settore avicolo. E' causata da protozoi appartenenti al genere *Eimeria*. Nel pollo sono note sette differenti specie appartenenti a questo genere, ognuna delle quali colpisce determinati tratti dell'intestino. Nel pollo da carne le specie di maggiore interesse sono *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella*. Quest'ultima è la più nota e nello stesso tempo la più facile da diagnosticare, anche in campo. *Eimeria tenella* provoca caratteristiche lesioni macroscopiche a livello cecale responsabili di significativi indici di mortalità nei soggetti colpiti, ma non ha effetti evidenti sulle performance produttive. Al contrario, la coccidiosi provocata da *Eimeria acervulina* e da *Eimeria maxima* è in genere responsabile, anche in forma

lieve o addirittura sub-clinica, di peggioramenti degli indici di crescita e degli indici di conversione dell'alimento nei gruppi colpiti. Oltre che su adeguati interventi gestionali, il controllo della coccidiosi si basa sull'impiego alternato di coccidiostatici e di vaccini. In caso di comparsa di episodi clinicamente manifesti di coccidiosi si può ricorrere all'impiego, nell'acqua di bevanda, di farmaci anticoccidici appartenenti a quattro categorie principali: amprolium, toltrazuril, sulfonamidi e sulfonamidi potenziati con diaminopirimidine. L'azione anticoccidica di quest'ultima associazione è nota da molto tempo. Tuttavia sono pochi (e molto datati) gli studi clinici di efficacia di questa combinazione nei confronti della coccidiosi del pollo. Ad esempio, Mathis G.F. et al. (1984) hanno testato l'efficacia dell'associazione trimetoprim/sulfachinossalina (in rapporto 1:3) nei confronti di singole specie appartenenti al genere *Eimeria* cominciando la somministrazione del farmaco il giorno stesso dell'infezione sperimentale. Il presente lavoro riporta parte dei risultati di una prova di efficacia clinica (condotta nel gennaio 2012) di un'associazione trimetoprim+sulfadimetossina (rapporto 1:5) in polli da carne infettati sperimentalmente con un'associazione di *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella* e trattati alla comparsa dei segni clinici di coccidiosi e, in particolare, della mortalità provocata dall'infezione sperimentale.

## MATERIALI E METODI

### *Animali e condizioni di allevamento*

Sono stati utilizzati 100 polli da carne (ROSS 308 di sesso femminile, 1 giorno di vita) forniti da un incubatoio locale e non vaccinati nei confronti della coccidiosi.

I soggetti sono stati introdotti, in isolatori per specie aviari (Allentown®) dotati di mangiatoie a tramoggia e di abbeveratoi a campana. Alimento (mangime per polli da carne privo di coccidiostatico) e acqua di bevanda sono stati somministrati *ad libitum* per tutta la durata della prova.

### *Protocollo sperimentale*

Gli animali sono stati suddivisi casualmente in 5 gruppi da 20 soggetti ciascuno. All'età di 20 giorni è stato prelevato, da ciascun isolatore, un pool di feci per verificare l'assenza di coccidi.

All'età di 21 giorni tutti i gruppi sono stati infettati per via endo-esofagea con 1 ml/capo di una sospensione contenente le seguenti concentrazioni di oocisti: 5000 oocisti di *E.tenella*, 5000 oocisti di *E.maxima*, 10.000 oocisti di *E.acervulina*.

Le oocisti sono state isolate da casi clinici di coccidiosi osservati in gruppi di polli da carne e di pollastre. Il contenuto intestinale dei soggetti colpiti è stato prelevato e conservato a temperatura di refrigerazione in soluzione al 2% di bicromato di potassio. Per la preparazione dell'inoculo sperimentale il materiale prelevato è stato filtrato su garza e lasciato decantare per una notte aggiungendo del potassio bicromato al 2%. Il giorno seguente è stato eliminato il surnatante, mentre il deposito è stato risospeso in soluzione satura di saccarosio, miscelato e centrifugato (2000 rpm per 10 minuti). Le oocisti sono state in seguito prelevate dalla parte superficiale della sospensione e diluite in acqua distillata. Successivamente, le oocisti sono state fatte sporulare a 30°C per 72 ore mediante insufflazione di aria nella massa del liquido. Infine le oocisti sporulate sono state contate al microscopio ottico mediante l'utilizzo della camera di Mc Master. La concentrazione finale di oocisti sporulate è stata ottenuta attraverso diluizioni in acqua distillata.

Dal giorno seguente l'infezione i gruppi sono stati sottoposti ad esame clinico quotidiano.

#### *Protocollo terapeutico*

La terapia è cominciata il giorno in cui è iniziata la mortalità. Il prodotto utilizzato contiene, per ml, 40 mg di trimetoprim e 200 mg di sulfadimetossina (Prazil N orale ®– Boehringer Ingelheim).

E' stato adottato il seguente protocollo terapeutico:

- Gruppo "A": nessun trattamento (gruppo di controllo).
- Gruppo "B": 0,5 ml/L di acqua di bevanda per 5 giorni consecutivi.
- Gruppo "C": 1 ml/L di acqua di bevanda il primo giorno e 0,5 ml/L di acqua di bevanda per 4 giorni consecutivi.
- Gruppo "D": 1 ml/L di acqua di bevanda per 5 giorni consecutivi.
- Gruppo "E": 2 ml/L di acqua di bevanda il primo giorno e 1 ml/L di acqua di bevanda per 4 giorni consecutivi.

#### *Indagini di laboratorio*

Durante la prova tutti i soggetti deceduti sono stati sottoposti ad esame anatomico-patologico per la valutazione del *lesion score* intestinale secondo lo schema descritto da Johnson et al. (Tabella 1).

Trascorsi 2 giorni dal termine del trattamento i soggetti sopravvissuti sono stati sottoposti per dislocazione cervicale e sottoposti ad esame anatomico-patologico per la valutazione del *lesion score* intestinale sempre secondo lo schema descritto da Johnson J. et al.

#### *Analisi statistica*

L'efficacia dei protocolli terapeutici è stata valutata confrontando, per ciascuna specie di *Eimeria*, i valori di *lesion score* nei gruppi trattati (B, C, D, E) rispetto al gruppo di controllo (A). Sono state inoltre considerate le diverse tipologie di somministrazione (dosaggio continuo, B e D o dosaggio con dose di attacco più elevata, C e D). Per i diversi protocolli terapeutici è stata inoltre valutata la proporzione di soggetti senza lesioni (score 0), con lesioni moderate (score 1 o 2) o con lesioni gravi (score 3 o 4) rispetto al gruppo di controllo. Previa valutazione della normalità della distribuzione campionaria, effettuata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov, i confronti sono stati eseguiti utilizzando i test U di Mann-Whitney, l'analisi della varianza non parametrica secondo Kruskal-Wallis o il test chi-quadrato. Le analisi sono state effettuate utilizzando il software IBM-SPSS ver. 23.

## **RISULTATI**

Il trattamento è iniziato a 35 giorni di età ossia 14 giorni post-infezione. I gruppi infettati hanno cominciato a manifestare segni clinici riferibili a coccidiosi dopo 6 giorni dall'infezione. La mortalità è stata osservata il giorno di inizio trattamento in tutti i gruppi infettati ed è proseguita per altri due giorni solo nel gruppo di controllo. Come evidenziato dai valori di *lesion score* l'infezione sperimentale ha consentito di riprodurre efficacemente lesioni macroscopiche riferibili a *E.acervulina* e a *E.tenella*. Meno evidenti, anche nel gruppo di controllo, sono risultate le lesioni del tratto intermedio dell'intestino riferibili a *E.maxima*, nonostante le dosi infettanti fossero

in linea con quanto precedentemente pubblicato. Si può pertanto ipotizzare una ridotta vitalità delle oocisti sporulate di *E.maxima* rispetto alle altre specie impiegate nella prova.

Complessivamente, i gruppi trattati con le diverse posologie hanno presentato valori significativamente inferiori ( $p < 0,001$ ) di *lesion score* rispetto al gruppo di controllo (Fig.1 ). Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i trattamenti B e C in termini di riduzione del *lesion score* intestinale, così come non appaiono diversi i risultati tra posologia costante (B e D) o variabile (C e E). La proporzione di animali senza lesioni (score 0), con lesioni moderate (score 1 o 2) o con lesioni gravi (score 3 o 4) è risultata significativamente diversa ( $p < 0,001$ ) nei diversi gruppi, con percentuali di soggetti con lesioni moderate o gravi più elevata nel gruppo di controllo (Fig. 2).

## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

I risultati della prova hanno evidenziato come l'associazione trimetoprim+sulfadimetossina (rapporto 1:5) si sia dimostrata efficace nel controllo dell'infezione sperimentale sia in termini di riduzione della mortalità sia di gravità delle lesioni intestinali. Una significativa riduzione del *lesion score* intestinale è stata osservata nei confronti di tutte le specie appartenenti al genere *Eimeria* impiegate nell'infezione sperimentale. L'associazione può pertanto essere utile nel controllo delle principali specie appartenenti al genere *Eimeria* responsabili di coccidiosi nel pollo da carne. L'associazione è risultata inoltre essere efficace anche in presenza di infezioni miste. L'efficacia del trattamento è stata evidenziata anche al dosaggio più basso (0,5 ml/L di acqua di bevanda per 5 giorni consecutivi) impiegato nello studio. Occorre tuttavia ricordare che la scelta del dosaggio e del protocollo terapeutico deve essere fatta tenendo in considerazione la situazione clinica e gestionale dell'allevamento. A differenza di altri studi pubblicati in letteratura (in cui l'inizio del trattamento è coinciso con l'infezione sperimentale) il presente lavoro ha rilevato come l'impiego dell'associazione trimetoprim+sulfadimetossina (rapporto 1:5) possa essere efficace nel controllo della coccidiosi anche se iniziato in una fase avanzata dell'infezione (ossia alla comparsa di segni clinici e di mortalità) rispettando in questo modo le attuali linee-guida sull'impiego prudente e ragionato del farmaco veterinario.

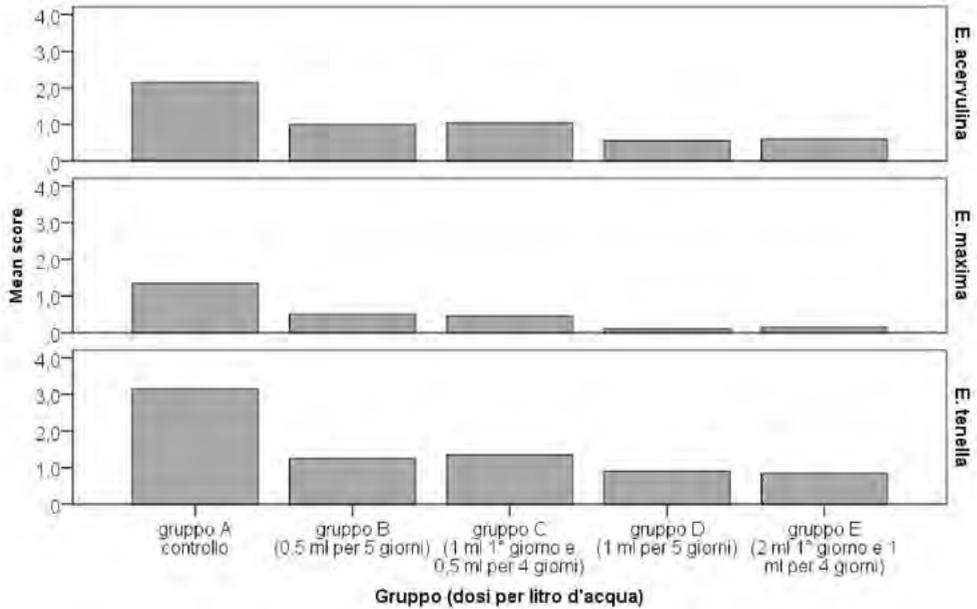
## BIBLIOGRAFIA

1. Eckert J. et al. (1995), guidelines on techniques in coccidiosis research. COST 89/820.
2. Johnson J. et al. (1970), anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental parasitology* 28, 30-36.
3. Mathis G.F., McDougald L.R. (1984), effectiveness of therapeutic anticoccidial drugs against recently isolated coccidia. *Poultry Science* 63, 1149-1153.
4. Mathis G.F. et al. (2004), coccidiosis control by administering toltrazuril in the drinking water for a 2-day period. *Veterinary Parasitology* 121, 1-9.
5. Urquart G.M. (1987), *Veterinary parasitology*. Ed. Longman Scientific and Technical. First published 1987, Essex CM202JE, England, p.270.
6. White G, Williams R.B. (1983), evaluation of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline for the treatment of bacterial and coccidial diseases of poultry. *The Veterinary Record* 24/31, 608-612.

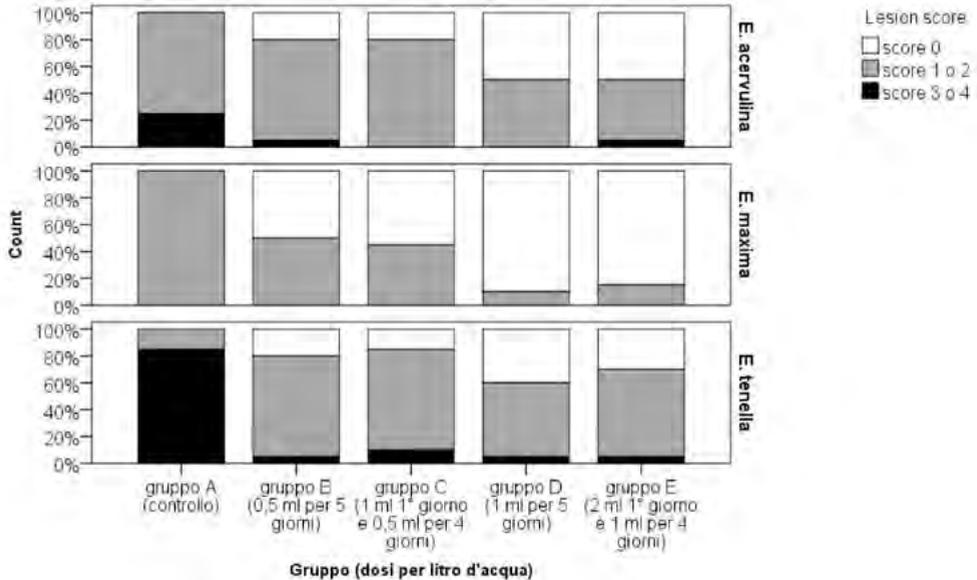
**Tabella 1:** *Lesion score* intestinale come descritto da Johnson J. et al. (1970)

SPECIE	Punteggio				
	“0”	“1”	“2”	“3”	“4”
<i>E.acervulina</i>	Assenza di lesioni	Piccole lesioni biancastre osservabili sulla mucosa del duodeno	Lesioni più frequenti ed estese ma non coalescenti	Lesioni coalescenti, ispessimento della parete e contenuto acquoso del duodeno	Mucosa del duodeno grigiasta e congesta, notevole ispessimento della parete, presenza di essudato biancastro di consistenza cremosa
<i>E.maxima</i>	Assenza di lesioni	Petecchie emorragiche osservabili sulla sierosa del tratto intermedio dell'intestino	Numerose petecchie emorragiche sulla sierosa, contenuto mucoso di colore arancio del tratto intermedio dell'intestino	Oltre alle lesioni del punto precedente il tratto intermedio dell'intestino si presenta dilatato e la parete intestinale appare ispessita.	Oltre alle lesioni del punto precedente si osserva un contenuto necrotico-emorragico del tratto intermedio dell'intestino
<i>E.tenella</i>	Assenza di lesioni	Petecchie emorragiche sulla parete dei ciechi, contenuto cecale normale	Numerose petecchie emorragiche, presenza di tracce di sangue nel contenuto cecale	Abbondante presenza di sangue nei ciechi, assenza di materiale fecale, ispessimento della parete dei ciechi	Ciechi dilatati con contenuto emorragico-caseoso

NOTA: il punteggio “4” viene attribuito ai soggetti deceduti per coccidiosi.



**Figura 1.** Valore medio del *lesion score* intestinale per specie di *Eimeria* e protocollo terapeutico



**Figura 2.** Percentuale di soggetti senza lesioni (score 0), con lesioni moderate (score 1 o 2) o con lesioni gravi (score 3 o 4) per specie di *Eimeria* e protocollo terapeutico

## **GENOTIPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE CIRCOLANTI NEGLI ALLEVAMENTI AVIARI NEL 2018**

Trogu T., Faccin F., Canziani S., Lelli D., Sozzi E., Lavazza A., Moreno A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, via Bianchi, 9 – 25124, Brescia*

### **Summary**

Avian infectious bronchitis (IB) is a highly contagious viral disease caused by a *Coronavirus* (IBV). It is considered an important cause of economic losses in the poultry industry affecting primarily the respiratory tract but potentially spreading to other organs. The high mutation and recombination rate of IBV has led to the emergence of several new variants that contribute to incomplete protection by current vaccines. In this study we investigate different genotypes in poultry farms with different types of productions characterized by absence of IB clinical symptoms. In January and February 2018, in North Italy, 190 pool of 10 tracheal swabs each one have been analyzed by RT-PCR and successively sequenced. Genotypes 793B, QX and M41 are the most observed, with a total prevalence of 62%. Genotypes recognized are in agreement with current vaccines used, but only a part of samples has a complete identity with the vaccine sequence. This partial variance and the presence of 22% of mixed sequences suggest a potential modification of the virus that could led to clinical symptoms and economic losses.

### **INTRODUZIONE**

La bronchite infettiva aviare è una patologia del pollo a diffusione mondiale, caratterizzata da lesioni a carico degli apparati respiratorio, riproduttivo e dei reni. Questa patologia è soprattutto presente nei paesi in cui l'industria avicola è altamente sviluppata e determina notevoli perdite economiche, legate fondamentalmente alla scarsa crescita, al peggioramento dell'indice di conversione, all'aumento del numero di scarti e di mortalità nei broilers, al calo dell'ovodeposizione e alla minore qualità dell'uovo nelle ovaiole e nei riproduttori. Il virus della Bronchite Infettiva (IBV) appartiene alla famiglia *Coronaviridae* e, insieme a quello del tacchino e del fagiano, viene inquadrato nel genere *Gammacoronavirus*. E' caratterizzato da un'elevata variabilità antigenica riconducibile fondamentalmente alle modificazioni che si verificano a carico di una sola proteina strutturale, la proteina S degli spikes, e in particolare della S1, una delle due sub-unità che la compongono. A partire del 1956 (3), si sono progressivamente identificati nuovi sierotipi o varianti di IBV nei vari continenti e a oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi, anche se si pensa che solo una piccola parte di quelli esistenti sia stata individuata. La continua comparsa di nuove varianti IBV avviene malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti contenenti singole varianti (M41, 793B, QX) o associazioni tra di esse. La mancanza di una protezione vaccinale completa determina in molti casi la comparsa di forme cliniche sempre più variabili che vanno dalle respiratorie o renali, più frequenti nei broilers, a

quelle caratterizzate da calo di ovodeposizione e alterazione della qualità del guscio, tipiche di ovaiole e riproduttori. Il frequente riscontro di nuove varianti antigeniche può quindi rendere problematica la realizzazione di adeguate profilassi immunizzanti e, per questo motivo, le indagini epidemiologiche indirizzate alla caratterizzazione dei ceppi IBV, isolati in ogni territorio, risultano di notevole importanza nella scelta di programmi vaccinali in grado di conferire una buona protezione.

Lo scopo di questo lavoro è indagare i genotipi IBV circolanti in animali vaccinati senza sintomatologia respiratoria appartenenti a diverse tipologie produttive, allo scopo di meglio comprendere la diffusione del virus IBV negli allevamenti vaccinati.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

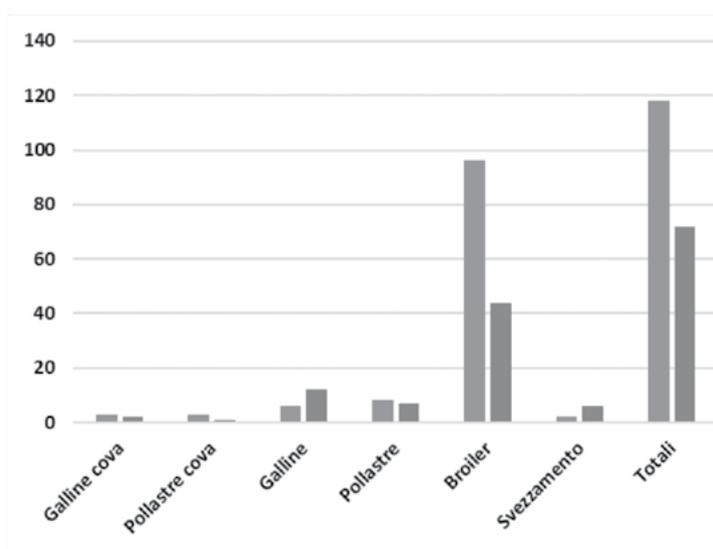
Sono stati analizzati 190 pool di 10 tamponi tracheali ciascuno, raccolti da allevamenti siti nelle province di Bergamo, Brescia, Cremona, Mantova e Lodi nei mesi di Gennaio-Febbraio 2018. I campioni sono stati raccolti da animali senza sintomatologia respiratoria che provenivano da allevamenti di diverse tipologie produttive, ovaiole (18,8%), broiler (73%), riproduttori (3,8%) e svezzatori (4,4%).

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

L'RNA totale è stato estratto utilizzando trizol reagent (Invitrogen, USA) come da istruzioni. L'RNA così estratto è stato sottoposto a reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (1) del virus, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®). Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 7 utilizzando il metodo neighbour-joining, modello Kimura 2 parametri. Le topologie evidenziate sono state confermate con i metodi maximum likelihood e maximum parsimony.

## **RISULTATI**

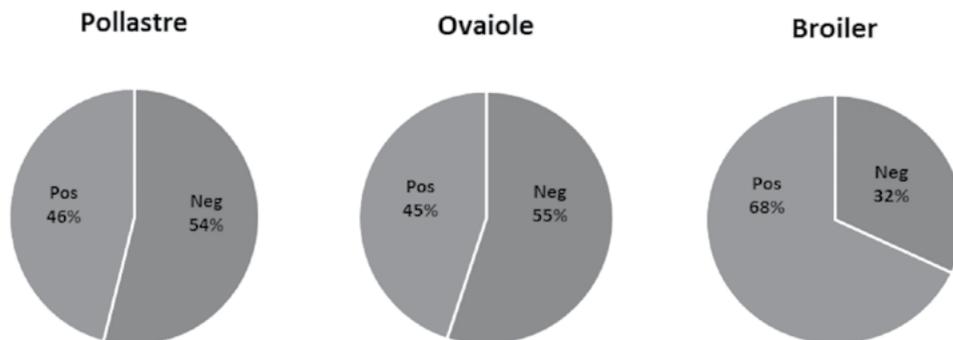
La RT-PCR eseguita direttamente sui tamponi tracheali ha evidenziato una positività per IBV in 118 campioni (62%). Nel grafico 1 vengono riportati i campioni analizzati divisi per risultato e per tipologia produttiva.



**Grafico 1:** N. di campioni testati divisi per tipologia produttiva e per risultato alla RT-PCR per IBV

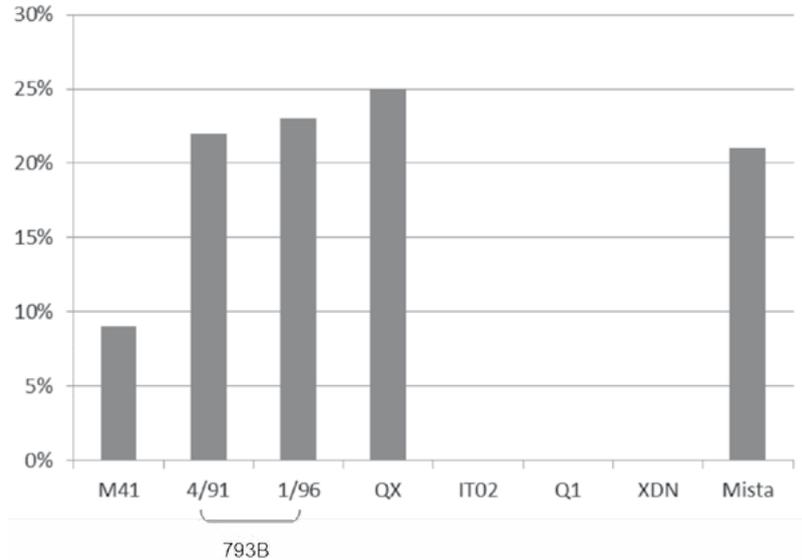
Confrontando le diverse tipologie produttive si può notare come i broiler rappresentino la categoria con una percentuale più alta di positività. La tendenza, anche nelle altre tipologie di allevamento, è quella di avere una percentuale di positività maggiore rispetto ai campioni negativi.

Per dare un'idea grafica della divisione tra campioni positivi e negativi in ogni tipologia produttiva si riporta il grafico 2.

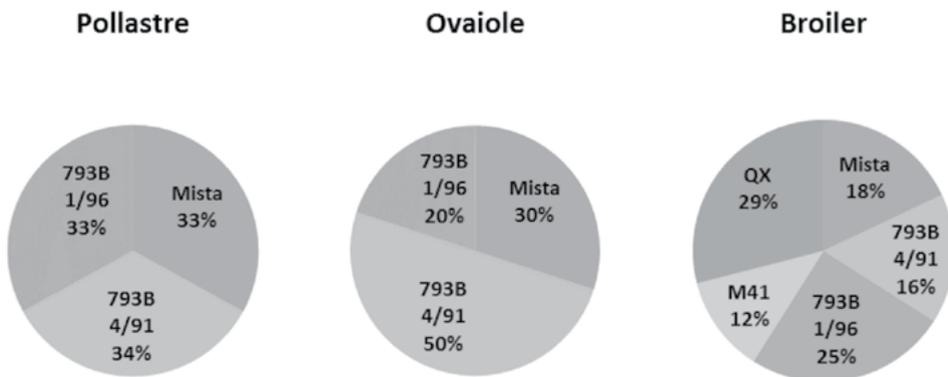


**Grafico 2:** Percentuale di campioni negativi e positivi IBV per tipologia produttiva

I genotipi più frequentemente osservati sono stati il 793B (1/96 incluso) e il QX con percentuali del 56% e 27% rispettivamente (Grafico 3 e 4). Altro genotipo identificato, seppur con percentuale minore è M41 (Massachusetts). Da rilevare la assenza di genotipi quali Guangdong/Xindadi e 624I/Q1 che con percentuali variabili venivano rilavati tutti gli anni. Si conferma l'assenza del genotipo IT02 molto frequente negli anni 2000.



**Grafico 3:** Percentuale di genotipi rilevati



**Grafico 4:** Percentuali di genotipi rilevati nelle diverse tipologie di allevamento

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati delle presenti analisi hanno evidenziato una prevalenza piuttosto elevata di IBV negli allevamenti avicoli (62%), coinvolgendo tutte le tipologie produttive. Tuttavia, scorporando il dato, tale evidenza emerge soprattutto negli allevamenti vocati alla produzione di carne, che presentano il 68% di positività contro il 45-46% rilevato negli allevamenti di ovaiole e pollastre. Questo dato è presumibilmente riconducibile all'entità del campionamento: 140 pool di tamponi trachali effettuati sui broiler.

I genotipi riscontrati più frequentemente (793B, QX e M41) sono espressione dei piani vaccinali attualmente in vigore ed effettuati regolarmente nell'area di studio. Il genotipo M41 è stato isolato in percentuale nettamente minore rispetto a 793B e QX. Il suo riscontro è avvenuto solo nei broiler, mentre si registra l'assenza sia nelle ovaiole che nelle pollastre. Questo risultato può essere messo in relazione con i cicli piuttosto lunghi negli allevamenti di produzione uova che talvolta non permettono l'identificazione tardiva del virus.

Il sequenziamento ha permesso di confrontare gli isolati con i ceppi vaccinali attualmente in uso. Nello specifico il 64% delle sequenze riferibili al genotipo 793B raggiunge una perfetta concordanza con i corrispondenti ceppi vaccinali, in misura del 53% per i ceppi riferibili a 4/91 e del 74% per il 1/96. Per quanto riguarda il genotipo QX, il 48% delle sequenze isolate presenta il 100% di identità con il ceppo vaccinale di riferimento. La restante parte delle sequenze presenta una percentuale di identità con il genotipo vaccinale inferiore al 99,7%. Tra le sequenze analizzate, il 22% è rappresentato da sequenze miste nelle quali non è stato possibile identificare un singolo genotipo. Questo potrebbe indicare la coesistenza di ceppi vaccinali e ceppi di campo all'interno del medesimo allevamento. La non perfetta concordanza tra le sequenze isolate e quelle dei ceppi vaccinali, potrebbe indicare una iniziale fase di mutazione puntuale del virus. Considerando che mutazione e ricombinazione rappresentano caratteristiche distintive del genoma virale, la presenza di ceppi diversi nello stesso allevamento (compresi quelli di campo) può favorire l'insorgenza di nuove varianti con diversa patogenicità e virulenza, che potrebbero esitare nella comparsa di forme cliniche e conseguenti perdite economiche.

In conclusione, monitorare costantemente la presenza e la tipologia dei genotipi circolanti negli allevamenti, permette una corretta valutazione della profilassi vaccinale effettuata e fornisce quindi gli strumenti per tenere sotto controllo l'evoluzione e la diffusione del virus.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and Naylor CJ. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28:593-605.
2. Ji J, Xie J, Chen F, Shu D, Zuo K, Xue C, Qin J, Li H, Bi Y, Ma J and Xie Q. (2011). Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009. *Virol J.* 8:184
3. Jungherr EL, Chromiak TW and Luginbuhl RE. (1956). Immunological differences in strains of Infectious bronchitis. Proc. 6th Ann. Meet. USLSA, 203-205.

4. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuve P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-2463
5. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
6. Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH and Jackwood MW. (2011). Recombination in Avian Gamma-Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Viruses* 3: 1777-1799.

# VALUTAZIONE DELLA CINETICA DI CEPPI VACCINALI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA SOMMINISTRATI VIA GELA BROILER DI UN GIORNO DI VITA

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Bianco A.<sup>1</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Ramon G.<sup>3</sup>, Paulet P.<sup>3</sup>, Koutoulis K.C.<sup>4</sup>, Drigo M.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Ceva Salute Animale, Viale Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB), Italia

<sup>3</sup> Ceva Santé Animale, 10 Avenue de la Ballastiere, 33500 Libourne, Francia

<sup>4</sup> Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Thessaly, Trikalon 224, 43100 Karditsa, Grecia

## Summary

Infectious bronchitis control requires great efforts and is extremely impacting on management and productivity. For this reason, a careful evaluation of vaccination procedures and protection mechanisms should be mandatory, as new vaccination strategies or delivery methods are proposed. This study aimed to explore B-48 and 1/96 strain kinetics after vaccination by gel administration and compare it with previously obtained vaccine kinetics of vaccines administered by spray. Based on our results, no differences related to the administration route were demonstrated, being gel administration able to guarantee a good coverage and efficient vaccine replication. As a secondary study objective, the relationship between viral titers detected in individual swab samples and pooled swab ones was investigated, displaying the pooled sample tendency to mirror the highest individual swab titer.

## INTRODUZIONE

La Bronchite infettiva (BI) è una delle patologie di maggiore impatto economico in ambito avicolo (Cavanagh & Gelb, 2012), sia dal punto di vista produttivo e della salute animale, con vistosi cali di produzione e compromissione delle performance, sia del management, che si avvale di articolate misure di profilassi e dell'associazione di differenti ceppi vaccinali per assicurare un più ampio spettro di protezione (Jordan, 2017), nei confronti dell'elevata variabilità del virus della Bronchite infettiva (IBV). Una delle combinazioni più comunemente adottate in Italia e in Europa (Franzo et al., 2016), sulla base di una comprovata efficacia nei confronti di svariati ceppi di campo (Cook et al., 1999), prevede un vaccino basato sul genotipo Mass (H120, M41, Ma5) associato a uno appartenente al genotipo 793/B (1/96, 4/91, CR88), o QX (Franzo et al., 2016). Per ragioni di incompatibilità chimica (Collett, 2013), o per motivi commerciali e legali, talvolta la somministrazione in unica soluzione di due vaccini per via spray non può essere effettuata in incubatoio ad un giorno di vita. Per ovviare a questi limiti è necessario prevedere l'esecuzione di due somministrazioni separate ma consecutive in incubatoio, oppure somministrare la seconda vaccinazione all'arrivo in azienda, pur riconoscendo i limiti pratici intrinseci di questa procedura (Collett, 2013), oltre alla sua onerosità in termini di tempo e manodopera. In aggiunta, una minor copertura vaccinale della popolazione è stata associata a quest'ultima strategia (Yegani & Butcher, 2009), predisponendo quindi ad una maggiore suscettibilità ad eventuali ceppi di campo in ingresso o a reversione a virulenza dei ceppi vaccinali stessi (McKinley

et al., 2008). Soprattutto per l'immunizzazione del pollo da carne, una corretta attuazione del protocollo vaccinale con la somministrazione dei due vaccini ad inizio ciclo potrebbe essere sufficiente a garantire un'elevata e duratura protezione. A tale riguardo, la vaccinazione tramite gel introduce un mezzo che può garantire la stessa rapidità operativa della vaccinazione spray e nel contempo la stabilità dei vaccini in caso di somministrazione contemporanea, come già osservato per i vaccini per la coccidiosi (Chapman et al., 2002) e la malattia di Newcastle (Al-Attar & Lee, 2011). Per esaminare l'applicabilità della vaccinazione gel alla profilassi della Bronchite infettiva, è stata quindi pianificata una prova sperimentale che permettesse di valutare la replicazione virale a livello di epitelio respiratorio nel singolo animale, la copertura vaccinale degli animali e i trend dei titoli virali a livello di popolazione. I risultati ottenuti sono stati inoltre confrontati con i dati già presenti sulla cinetica di vaccini analoghi, somministrati via spray (Tucciarone et al., 2018).

## MATERIALI E METODI

### *Trial clinico*

Per la prova sperimentale, sono stati selezionati 500 pulcini Ross 308, femmine di un giorno di vita, provenienti da riproduttori vaccinati contro il virus della Bronchite infettiva e un livello omogeneo di anticorpi materni, con un titolo medio pari a  $10^{3.49}$ . Gli animali sono stati divisi in cinque gruppi, destinati a ricevere protocolli vaccinali diversi e alloggiati in apposite scatole per la vaccinazione, rispettando la consueta numerosità adottata in incubatoio.

Il gruppo A è stato vaccinato con il ceppo 1/96 (CEVAC® IBird, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 1607E4S2KLB) tramite gel (Cevagel®, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (quantità di gel standard, 25cc/100 pulcini).

Il gruppo B è stato vaccinato con il ceppo B-48 (CEVAC® MASS L, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 0307E2S1KLA) e con il ceppo 1/96 (CEVAC® IBird, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 1607E4S2KLB) in due somministrazioni di gel separate ma consecutive (quantità di gel doppia, 50cc/100 pulcini).

Il gruppo C è stato vaccinato con il ceppo B-48 (CEVAC® MASS L, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 0307E2S1KLA) e con il ceppo 1/96 (CEVAC® IBird, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 1607E4S2KLB) in una singola somministrazione di gel (quantità di gel standard, 25cc/100 pulcini).

Il gruppo D è stato vaccinato con il ceppo B-48 (CEVAC® MASS L, Ceva Sante Animale, Libourne, France) (lotto 0307E2S1KLA) tramite gel (quantità di gel standard, 25cc/100 pulcini).

Il gruppo E ha ricevuto una soluzione *mock* somministrata via spray (25cc/100 pulcino con pressione 1.5 atm) ed è stato utilizzato solamente come gruppo di controllo per la valutazione dell'*intake* vaccinale.

Entrambe le soluzioni, gel e spray, sono state addizionate con il colorante V9030 Sterile Blue Dye (NEL Northeast Laboratory, Waterville, Maine, USA) per evidenziare l'assunzione del vaccino. La vaccinazione spray è stata somministrata con lo strumento DESVAC ELEC KIT (Ceva Desvac Campus, Saint-Barthélemy-d'Anjou, France), mentre quella gel è stata effettuata con la macchina DESVAC GEL DISPENSER (Ceva Desvac Campus, Saint-Barthélemy-d'Anjou, France).

Dopo la vaccinazione i pulcini sono stati lasciati nelle casse, in ambienti separati per evitare contaminazioni, per 30 minuti, in modo da non interferire con l'ingestione del vaccino e le attività di *preening*. A seguire, tutti gli animali sono stati ispezionati sin-

golarmente per valutare la colorazione della lingua come misura dell'avvenuta vaccinazione.

#### *Valutazione clinica*

Ventidue animali per ognuno dei quattro gruppi vaccinati con gel sono stati alloggiati in quattro stanze separate e allevati per 21 giorni, adottando elevate misure di biosicurezza e rispettando le norme relative al benessere animale. I restanti animali sono stati esclusi dal trial. Per ogni gruppo, 12 animali sono stati identificati con un numero progressivo (1-12), per essere esaminati clinicamente e campionati individualmente. Durante i primi 11 giorni, la sintomatologia è stata valutata attribuendo un punteggio, poi aggregato, a segni clinici specifici e di seguito riportato:

0-assenti;

1-scolo nasale chiaro;

2-scolo nasale torbido;

3-tumefazione dei seni infraorbitali e schiuma oculare.

La presenza di rantoli, congiuntivite ed eventuale sintomatologia enterica è stata valutata e registrata. Gli animali sono stati alimentati *ad libitum* e il loro peso è stato monitorato a 5, 10, 14 e 20 giorni.

#### *Campionamento e processazione dei campioni*

Il campionamento è stato effettuato su tutti gli animali mediante tamponi a livello di fessura palatina nei giorni 1, 2, 4, 7, 10, 14, 18 e 21. I tamponi ottenuti dagli animali non marcati sono stati processati in *pool* mentre quelli prelevati dai soggetti 1-10 sono stati gestiti individualmente. Gli animali 11 e 12 sono stati campionati per garantire una numerosità costante, in caso di mortalità tra gli animali marcati. I campioni sono stati processati per l'estrazione dell'RNA virale con il kit commerciale High Pure Viral RNA Kit (Roche, Basel, Switzerland), secondo le istruzioni del produttore.

Ogni campione è stato testato con due differenti Real-time RT-PCR (Tucciarone et al., 2018), validate specificamente per l'identificazione e la quantificazione del ceppo 1/96 e di ceppi Mass-like. Le reazioni sono state eseguite con il kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) utilizzando il termociclatore LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Switzerland).

#### *Analisi statistiche*

La differenza negli score clinici, nei titoli virali e anticorpali tra i gruppi è stata analizzata con i test di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, con correzione di Bonferroni. I dati riguardanti i diversi ceppi vaccinali sono stati analizzati indipendentemente; le medie dei pesi sono state confrontate fra gruppi per momento di misurazione ed eventuali differenze statisticamente significative sono state valutate con i test ANOVA e t-Student con correzione di Bonferroni. Il livello di significatività statistica per ogni analisi è stato fissato a  $p < 0.05$ .

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

La prima ispezione a seguito della vaccinazione ha evidenziato, in tutti i gruppi, la rapida ingestione delle gocce di gel contenenti il vaccino e l'uniformità di copertura degli animali del gruppo E (soluzione *mock spray*). L'esame della colorazione della lingua ha rivelato un contatto con la soluzione vaccinale omogeneo tra i gruppi, con il 98% delle lingue colorate nel gruppo A, 99% nel B, 94% nel C, 100% nel D e 99% nell'E, sottolineando come il gel sia risultato appetibile per i pulcini e quindi rapidamente consumato. In nessun gruppo si è verificata mortalità, né sono stati evidenziati sintomi enterici. La sintomatologia respiratoria si è dimostrata leggermente più mar-

cata nel gruppo A il primo giorno, ma generalmente trascurabile e completamente assente dall'undicesimo giorno di trial fino al termine del trial. Le medie dei pesi corporei sono risultate omogenee tra i gruppi e in linea con gli standard attesi della genetica (Aviagen, 2017). L'insieme di queste valutazioni ha suggerito la sicurezza della somministrazione tramite gel e confermato quella della combinazione dei ceppi vaccinali 1/96 e B-48 (Tucciarone et al., 2018).

Lo studio dei titoli virali dei campioni individuali e *pool* ha permesso di valutare la cinetica dei due ceppi vaccinali. Nei gruppi vaccinati con un solo ceppo, non è stata rilevata alcuna positività all'altro ceppo usato nel trial, indice di assenza di contaminazione tra i gruppi. Il ceppo 1/96 ha raggiunto titoli generalmente più alti del ceppo B-48, con i picchi maggiori intorno al decimo giorno (Fig. 1a). Tutti i *pool* sono risultati positivi, a uno o a entrambi i vaccini a seconda del gruppo, in tutti i punti di campionamento, tranne per il primo prelievo nel gruppo C. Il ceppo 1/96 ha mostrato andamento simile in tutti i gruppi, raggiungendo il valore più alto il giorno 10 nei gruppi A e B e il giorno 14 nel C, con un successivo calo. I titoli del ceppo B-48 invece si sono dimostrati meno omogenei tra i gruppi, con fluttuazioni leggere (Fig. 1a). La cinetica vaccinale si è dimostrata sostanzialmente sovrapponibile a quella ottenuta a seguito di vaccinazione spray, valutata in un precedente studio (Tucciarone et al., 2018).

I campioni individuali hanno invece rivelato il *coverage* vaccinale dei pulcini, sottolineando la presenza del ceppo 1/96 in tutti gli animali a partire dal 4° giorno nel gruppo A e dal 7° nei gruppi B e C, con due sole negatività nel gruppo C a 14 e 18 giorni (Tab. 1). Il ceppo B-48 ha mostrato un comportamento più intermittente (sebbene un solo animale sia risultato negativo in tutti i campionamenti per tutta la durata dello studio) (Tab. 1) e una maggiore variabilità entro lo stesso punto di prelievo (Fig. 1b, 2). Il monitoraggio ripetuto dello stesso animale ha permesso di evidenziare con una curva di Kaplan-Meier, come la probabilità riscontrare il vaccino nel singolo animale raggiunga il 100% già entro il settimo giorno per il ceppo 1/96, mentre per quanto riguarda il ceppo B-48 in alcuni pulcini non si è riscontrata replicazione vaccinale fino all'ultimo giorno. L'utilizzo del medesimo campione per testare la presenza di entrambi i vaccini ha permesso di valutare l'eventuale competizione tra i due ceppi. Sebbene questa ipotesi e il prevalere del ceppo 1/96 possano giustificare questo scenario, l'analogo comportamento di entrambi i vaccini sia somministrati singolarmente sia in associazione permette di escludere questa dinamica. La differenza nei titoli vaccinali può essere quindi imputata a caratteristiche proprie dei ceppi, come un diverso grado di attenuazione, diversa capacità replicativa o tropismo, che possano quindi influenzare la replicazione del ceppo B-48. Uno studio longitudinale di campo più esteso permetterebbe di esplorare l'andamento delle cinetiche vaccinali fino a fine ciclo, per comparare le informazioni raccolte sul ceppo B-48 con quelle riguardanti altri ceppi Mass-like e permetterebbe di valutare un eventuale effetto *rebound* dei titoli del B-48 in corrispondenza con il già identificato calo del 1/96 intorno al 20° giorno (Tucciarone et al., 2018), per esaminare ulteriormente la possibilità di una competizione dei due ceppi.

La relazione tra titoli virali dei campioni individuali e dei *pool* entro lo stesso campionamento ha mostrato come il *pool* di tamponi non restituisca né una somma né una media dei titoli virali dei singoli tamponi, quanto piuttosto rispecchi il titolo più alto tra i singoli campioni (Fig. 2). Questo risultato può essere utile per pianificare il tipo di studio più adatto in funzione delle informazioni che si vogliono ottenere: il

campione individuale si renderà necessario per stimare il *coverage* vaccinale, come conseguenza di una corretta pratica di vaccinazione e il grado di circolazione del vaccino all'interno del gruppo, mentre il *pool*, oltre a restare un efficace ed economico strumento per la rilevazione di ceppi di campo, può fornire indicazioni di massima sulla cinetica vaccinale, soprattutto nell'ambito di uno studio longitudinale.

## CONCLUSIONI

L'utilizzo del gel nella vaccinazione contro il virus della Bronchite infettiva si è rivelato sicuro dal punto di vista clinico, non essendo state riscontrate reazioni avverse di tipo respiratorio o enterico. Inoltre, la cinetica vaccinale si è dimostrata sovrapponibile a quella ottenuta a seguito di vaccinazione spray, con titoli elevati riscontrati nel primo tratto respiratorio a seguito di somministrazione di entrambi i vaccini. Il confronto tra campioni analizzati in singolo e in *pool* ha infine mostrato l'assenza di un effetto cumulativo dei singoli tamponi nel titolo virale complessivo restituito dal *pool*.

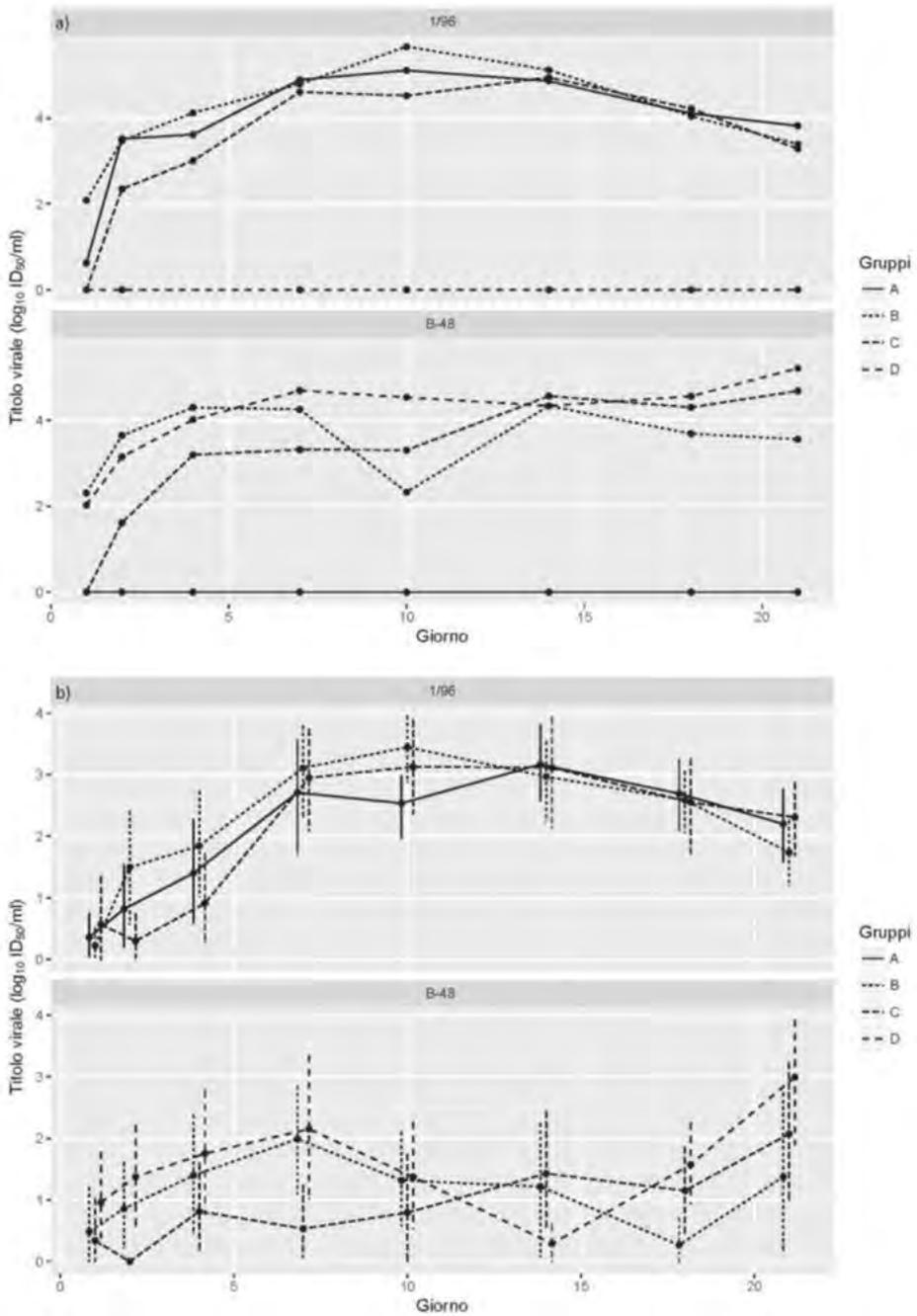
## BIBLIOGRAFIA

1. Aviagen (2017). Ross® 308 AP Broiler Performance Objectives from 2017. Available at [http://la.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Ross\\_Broiler/Ross-308AP-Broiler-PO-2017-EN.pdf](http://la.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-308AP-Broiler-PO-2017-EN.pdf)
2. Al-Attar, M. A., & Lee, E. H. (2011). Gel droplets vaccination method for the delivery of Newcastle Disease Vaccine in the barn. In *Western Poultry Disease Conference* (p. 71).
3. Cavanagh, D., & Gelb, J. (2012). Infectious bronchitis. In *Diseases of poultry* (Vol. Oxford, UK, pp. 117–135).
4. Chapman, H., Cherry, T. E., Danforth, H. D., Richards, G., Shirley, M. W., & Williams, R. B. (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 617–629.
5. Collett, S. R. (2013). Principles of disease prevention, diagnosis, and control introduction. *Diseases of Poultry, Oxford, UK*, 4–60.
6. Cook, J. K. A., Orbell, S. J., Woods, M. A., & Huggins, M. B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology*, 28(5), 477–485.
7. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Blanco, A., Nofrarias, M., Biarnés, M., Cortey, M., ... Cecchinato, M. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine*, 34(46), 5670–5676.
8. Jordan, B. (2017). Vaccination against infectious bronchitis virus: a continuous challenge. *Veterinary Microbiology*.
9. McKinley, E. T., Hilt, D. A., & Jackwood, M. W. (2008). Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine*, 26(10), 1274–1284.
10. Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., ... Cecchinato, M. (2017). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-time RT-PCR quantification. *Poultry Science*.
11. Yegani, M., & Butcher, G. D. (2009). Proper vaccination for healthy flocks. *World Poultry*, 25(7), 1–4.

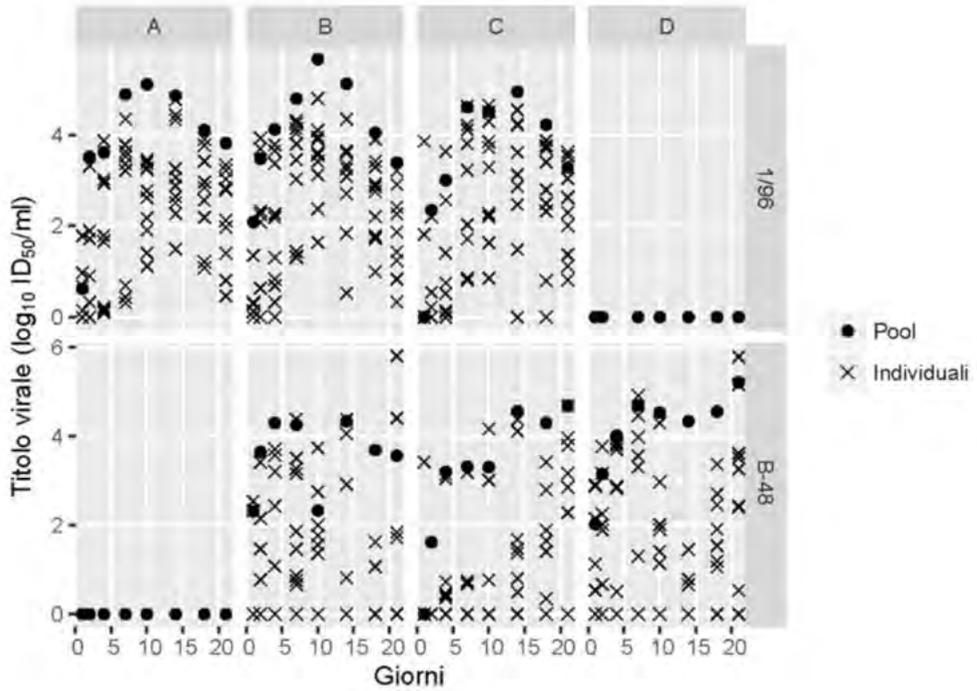
**Tabella 1:** risultati delle real time RT-PCR specifiche per i ceppi B-48 e 1/96, per gruppo, animale e punto di campionamento.

B-48	Birds	Day								1/96	Birds	Day							
		1	2	4	7	10	14	18	21			1	2	4	7	10	14	18	21
<b>B</b>	1	-	-	-	+	+	+	-	+	<b>B</b>	1	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+	+	+		2	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	+	+	-	-	-	-		3	-	-	+	+	+	+	+	+
	4	-	+	-	+	-	-	+	+		4	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	+	+	-	-		5	-	+	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	-	+	+	-	-	-		6	+	-	+	+	+	+	+	+
	7	-	-	-	+	-	-	-	+		7	-	+	+	+	+	+	+	+
	8	-	-	-	-	-	-	-	-		8	-	-	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	-	-	-		9	-	-	-	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	-	-	-		10	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>C</b>	1	-	-	-	-	+	+	+	+	<b>C</b>	1	-	-	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	-	+	+	+		2	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	+	-	+	+	+	+	+	+		3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	+	-	-	-	-	-		4	-	-	+	+	+	+	+	+
	5	-	-	+	-	-	+	+	+		5	-	-	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	+	-	-	-	-	-		6	-	-	+	+	+	+	+	+
	7	-	-	-	+	-	+	-	-		7	-	+	-	+	+	+	+	+
	8	-	-	+	+	-	+	+	+		8	-	-	-	+	+	+	-	+
	9	-	-	+	+	-	+	+	+		9	-	-	+	+	+	+	+	+
	10	-	-	-	-	+	-	-	-		10	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>D</b>	1	+	+	+	+	+	+	-	+	<b>A</b>	1	-	-	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	+	+	+	+	+		2	-	-	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	+	-	+	+		3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	-	-	-	+	+		4	-	-	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+		5	-	-	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	-	-	-	-	+	+		6	-	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	-	-	+	+		7	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	-	+	-		8	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	-	+	+	+	+	-	+	+		9	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	-	-	+	-	-	-	-	+		10	-	-	+	+	+	+	+	+

**Figura 1:** confronto delle curve delle cinetiche dei due ceppi vaccinali 1/96 e B-48, per gruppo e per singolo punto di campionamento, tra campioni in pool (a) e tamponi individuali (b).



**Figura 2:** confronto dei titoli virali tra campioni in pool e individuali, entro il singolo punto di campionamento.







# ATTI DEL III SIMPOSIO SCIENTIFICO

## **POSTER**

Parma, 14 Settembre 2018



## **CAMPYLOBACTER SPP. E SELVAGGINA DA PENNA**

Borrelli L., Varriale L., Pace A., Russo T.P., Gargiulo A., Fioretti A., Dipineto L.

*Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II - Via F. Delpino 1, 80137 Napoli*

### **Summary**

The present study was undertaken with the aim to evaluate the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in living game birds in southern Italy. To achieve this goal, a total of 550 living game birds, equally shared between females and males, were examined. Thermotolerant *Campylobacter* spp. was isolated in 237 out of 550 (43.1%) living game birds analysed. *C. coli* (100%) and *C. jejuni* (14.8%) were identified by polymerase chain reaction. Adult game birds showed a significantly higher prevalence value ( $P < 0.001$ ) than younger individuals. These results reinforce the assumption that game birds may be considered as potential carriers of *Campylobacter* spp. for humans and other animal species.

### **INTRODUZIONE**

*Campylobacter* spp., nello specifico *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, sono tra i più comuni batteri responsabili di gastroenteriti acute nell'uomo nei paesi industrializzati (Dipineto et al., 2017). Entrambe le specie colonizzano la mucosa intestinale di vari animali, incluse le specie domestiche e l'uomo (Newell & Fearnley, 2003). Tuttavia, l'ambiente favorito sembra essere il tratto intestinale di diverse specie aviari dove *Campylobacter* spp. colonizza come ipotetico organismo commensale (Newell & Fearnley, 2003). Le attuali conoscenze scientifiche sulla presenza di questo microrganismo nella selvaggina da penna è frammentaria. Pertanto, per fornire ulteriori dati, la presente indagine è stata condotta con lo scopo di valutare la prevalenza di *Campylobacter* spp. nella selvaggina da penna (i.e. starne, fagiani e quaglie) in allevamenti del sud Italia.

### **MATERIALI E METODI**

#### *Campionamento*

Durante il periodo Aprile 2017/Aprile 2018 sono stati esaminati 550 volatili rappresentati da fagiani (n=240), starne (n=240), quaglie (n=70) provenienti da 3 allevamenti di selvaggina da penna ubicati nella regione Campania. I fagiani erano suddivisi in 120 maschi (60 giovani e 60 adulti) e 120 femmine (60 giovani e 60 adulti). Analoga suddivisione veniva operata per le starne, mentre le quaglie erano suddivise in 22 maschi (15 adulti e 7 giovani) e 48 femmine (36 adulti e 12 giovani). Tutti i volatili presentavano buone condizioni di salute. Su ciascun volatile si effettuava un tampone cloacale dietro consenso dell'allevatore che veniva posto in terreno di trasporto, conservato a +4° C e inviato al laboratorio entro 2 ore dalla raccolta.

### *Isolamento e identificazione*

Ciascun campione veniva inoculato in *Campylobacter* selective enrichment broth (Oxoid) e incubato a 42° C per 48 ore sotto condizioni di microaerofilia fornite dal CampyGen (Oxoid). Successivamente, ciascun campione veniva seminato su *Campylobacter* blood-free selective agar (CCDA; Oxoid). Dopo incubazione a 42° C per 48 ore, sempre in condizioni microaerofile, le piastre venivano esaminate per valutare il tipico aspetto delle colonie di *Campylobacter*. Le colonie “sospette” venivano sub-coltivate su sheep blood agar (Oxoid) e incubate a 42° C per 24 ore. Le colonie presuntive di *Campylobacter* spp. venivano sottoposte a *multiplex polymerase chain reaction* (PCR). L'estrazione del DNA veniva eseguita mediante PrepMan sample reagent (Applied Biosystems) seguendo il protocollo della ditta produttrice. Gli estratti di DNA venivano sottoposti ad una multiplex PCR per valutare la presenza delle specie *C. jejuni* e *C. coli* rispettivamente tramite i primer ICJ-UP e ICJ-DN, e ICC-UP e ICC-DN (Gargiulo et al., 2008). La PCR veniva eseguita come descritto da Gargiulo et al. (2008) e i prodotti venivano separati mediante elettroforesi in gel di agar (Gibco-BRL), colorati con etidio bromuro e visualizzati sotto luce UV.

I dati dei volatili (età e sesso, tutti categorici) venivano analizzati mediante analisi statistica univariata (chi-quadro di Pearson per l'indipendenza) usando *Campylobacter* spp. status (positivo / negativo) come variabile dipendente. L'analisi statistica veniva condotta mediante software SPSS 13 per Windows.

### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

*Campylobacter* spp. veniva isolato da 237/550 (43,1%; 95% intervallo di confidenza [IC] = 38,9 – 47,4%) tamponi cloacali analizzati. In particolare, 104/240 (43,3%; 95% IC = 37,0% - 49,9%) *Campylobacter* spp. provenivano da fagiani, 118/240 (49,2%; 95% IC = 42,7–55,7%) provenivano da starne e 15/70 (21,4%; 95% IC = 12,9 – 33,2%) da quaglie. Riguardo l'età degli animali campionati, fagiani e starne adulti mostravano una prevalenza statisticamente significativa più alta ( $P < 0,001$ ) rispetto a quelli giovani. Tale ritrovamento può essere relazionato al fatto che l'infezione da *Campylobacter* spp. negli uccelli è osservata tipicamente dalla seconda alla quarta settimana di vita (Newell & Fearnley, 2003) e potrebbe essere associata al calo degli anticorpi materni. Inoltre, gli adulti di tali specie vivono all'aperto e, pertanto, potrebbero entrare più facilmente a contatto con gli uccelli selvatici che agirebbero come importanti fonti di infezione. Di contro, il parametro età non era significativo per le quaglie. In merito al sesso, non vi erano differenze statisticamente significative ( $P > 0,1$ ). Per quel che concerne l'identificazione di specie, la PCR ha rilevato che il 100% dei ceppi di *Campylobacter* spp. isolati dai fagiani veniva identificato come *C. coli* (104/104), e 14/104 (13,5%) erano positivi anche a *C. jejuni*. Analogamente, il 100% dei ceppi di *Campylobacter* spp. veniva identificato nelle starne (118/118) e nelle quaglie (15/15) come *C. coli*. Di questi, 15/118 (12,7%) e 6/15 (40,0%) erano, rispettivamente, positivi anche a *C. jejuni*. Non è stato possibile fornire spiegazioni di tali risultati sebbene siano in linea con quelli di Nebola et al. (2007) che isolava *C. coli* con una prevalenza più alta rispetto a *C. jejuni* da selvaggina da penna in Repubblica Ceca.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati mostrano una alta prevalenza di *Campylobacter* spp. nella selvaggina da penna. Pertanto, tali specie aviari potrebbero essere considerate un potenziale carrier di *Campylobacter* spp. per gli animali e per l'uomo dal momento che sono frequentemente impiegate per il ripopolamento di aree protette (Parchi Nazionali, Riserve naturali) e aree di caccia, nonché come alimenti destinati al consumo umano.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dipineto L, Borrelli L, Pace A, Romano V, D'Orazio S, Varriale L, Russo TP and A Fioretti. (2017). *Campylobacter coli* infection in pet birds in southern Italy. Acta Vet. Scand. 59(1):6.
2. Gargiulo A, Rinaldi L, D'Angelo L, Dipineto L, Borrelli L, Fioretti A and LF Menna. (2008). Survey of *Campylobacter jejuni* in stray cats in southern Italy. Lett. Appl. Microbiol. 46:267–270.
3. Nebola M, Borilova G and I Steinhäuserova. (2007). Prevalence of *Campylobacter* subtypes in pheasants (*Phasianus colchicus* spp. *torquatus*) in the Czech Republic. Vet. Med. 52:496–501.
4. Newell DG and C Fearnley. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Appl. Environ. Microbiol. 69:4343–4351.



# IMPATTO DELL'APPLICAZIONE DI UNA MAPPA DI RISCHIO INTRODUZIONE DI INFLUENZA AVIARIA SULL'ALLEVAMENTO AVICOLO ALL'APERTO DELL'EMILIA-ROMAGNA

Santi A.<sup>1</sup>, Galletti G.<sup>1</sup>, Procopio A.<sup>1</sup>, Di Nardo S.<sup>1</sup>, Romanelli C.<sup>1</sup>, Loli Piccolomini L.<sup>2</sup>, Tamba M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorveglianza Epidemiologica Emilia-Romagna, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini".

<sup>2</sup> Servizio prevenzione collettiva e sanità pubblica, Direzione generale sanità e politiche sociali per l'integrazione, Regione Emilia-Romagna

## Summary

*Wild dabbling ducks are the main reservoir for avian influenza (AI) viruses, and pose an ongoing threat to commercial poultry flocks. Outdoor farms have a significantly higher risk for AI introduction than indoor farms. In 2013 and 2016 epidemics broke out in Northern Italy, included Emilia-Romagna region (E-R). Outbreak investigations and virus phylogenetic analysis showed that in E-R, AI viruses were first introduced into outdoor layer flocks, due to contact between free-ranging hens and wild waterfowl. After the above-mentioned AI outbreaks, in 2017 an index to quantify the risk of introduction of AI viruses in poultry farms was developed in E-R; this index represents the theoretical Density of AI Infected dabbling Ducks per sq.km (DID).*

*A DID cut-off of 0.23 was identified to define high risk areas for introduction of AI viruses. In Emilia-Romagna, the high risk area covers 43% of the territory and involves 40% of regional poultry farms. In this area only indoor farms are allowed.*

*This biosecurity measure has a relevant economic impact on free-range and organic poultry flocks, that should be moved to low risk areas or converted to conventional production. Considering the huge cost of outbreaks eradication and the need of preventing them, the restriction of outdoor farming to low risk areas is certainly the priority for Public Health.*

## INTRODUZIONE

Gli anatidi selvatici di superficie sono il principale reservoir dei virus di Influenza Aviaria (AI) (Comin et al., 2011) e costituiscono una costante minaccia per gli allevamenti avicoli. Gli allevamenti all'aperto hanno un rischio di infettarsi maggiore rispetto a quelli al chiuso: ad esempio, per le galline ovaiole all'aperto il rischio è 6 volte superiore (Bouwstra et al, 2017). In Emilia-Romagna (E-R) tra il 2013 e il 2017 sono occorsi diversi focolai di influenza aviaria ad alta e bassa patogenicità (HPAI e LPAI). I focolai primari delle epidemie di HPAI del 2013 e del 2016 si sono verificati in aziende di galline ovaiole allevate all'aperto in un'area ricca di avifauna selvatica, ed è stato dimostrato l'ingresso del virus in allevamento tramite contatto diretto o indiretto con uccelli selvatici (Bonfanti et al., 2014; Mulatti et al., 2017). A seguito di queste epidemie, nel 2016, per ridurre il rischio di introduzione di influenza aviaria, con disposizioni regionali è stato vietato l'allevamento di pollame all'aperto in una larga porzione del territorio dell' E-R.

Per meglio definire i territori interessati dal divieto, nel 2017 è stato sviluppato un indice di rischio di introduzione dei virus influenzali legato al possibile contatto con avifauna selvatica infetta (Density of AI-Infected Dubbling Ducks, DID) (Galletti et al., 2018) e disegnata una mappa di rischio.

Obiettivo dello studio è valutare l'impatto dell'applicazione di questa mappa di rischio sugli allevamenti avicoli regionali, in particolare per quelli di galline ovaiole e polli da carne all'aperto, considerando anche i costi delle misure di polizia veterinaria da sostenere in caso di focolai in queste strutture o in allevamenti ad essi collegati.

## **MATERIALI E METODI**

Per la definizione della mappa di rischio, il valore di DID è stato determinato utilizzando diversi parametri: la vicinanza ad aree umide, l'abbondanza di anatidi selvatici, l'estensione dei loro movimenti e la prevalenza di infezione (5%) (De Marco et al. 2005, Guberti et al. 2007).

DID rappresenta la densità teorica di anatidi infetti per km<sup>2</sup> e permette di classificare il territorio regionale in base al rischio di introduzione di virus influenzali. Ad ogni allevamento avicolo è stato associato un valore DID, relativo alla sua posizione geografica. Le soglie di valori DID che permettono di definire le aree a rischio sono state individuate attraverso l'analisi della curva ROC. Con questa analisi è possibile definire i migliori valori per discriminare tra allevamenti a rischio e non a rischio di diventare focolaio.

Per quanto riguarda il costo delle epidemie, sono stati presi in considerazione i costi diretti legati agli indennizzi e i costi operativi per le operazioni di abbattimento e smaltimento carcasse, la pulizia e la disinfezione, relativamente ai focolai e agli allevamenti dove è stato effettuato l'abbattimento preventivo (allevamenti a contatto o presenti in aree di depopolamento nei pressi di focolaio).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

DID fa registrare valori compresi tra 0 e 28 sul territorio dell'Emilia-Romagna. I valori che caratterizzano il territorio occupato da allevamenti avicoli variano da 0 a 18, con il 90% degli allevamenti interessato da valori DID inferiori a 1,2.

L'analisi della curva ROC ha indicato un efficace range di valori di DID compreso tra 0,2 e 0,4.

Il valore migliore individuato dalla curva ROC è 0,23 e in base a questa soglia è stata ottenuta una mappa di rischio, la cui area copre il 43% del territorio regionale e coinvolge il 40% degli allevamenti avicoli (366 su 920).

Il 76% dei focolai occorsi nel periodo 2000-2017 (30 su 39) è avvenuto in allevamenti che insistevano in aree con DID > 0,23; di questi, il 43% (13 su 30) ha coinvolto allevamenti che detenevano animali all'aperto.

L'impatto economico della detenzione al chiuso degli animali per alcune tipologie produttive, come il pollo da carne o la gallina ovaiole, è sicuramente notevole: l'allevamento all'aperto consente la produzione di alimenti molto richiesti dal consumatore e commercialmente più redditizi. Delle 81 strutture di queste tipologie produttive presenti sul territorio regionale, 31 ricadono nella zona a rischio: 14 allevamenti di polli da carne "all'aperto", un allevamento di polli da carne

“biologico”, due di galline ovaiole “all’aperto” e 14 allevamenti di galline ovaiole di tipo “biologico”, per un totale di circa 1.320.000 polli e 388.000 galline.

Per limitare l’impatto economico sul settore avicolo interessato da questa misura di biosicurezza, si è simulata l’applicazione del valore soglia più elevato, pari a 0,4. Con questa rimodulazione uscirebbero dalla zona a rischio 3 piccoli allevamenti di galline ovaiole biologiche (circa 36.000 capi) e 5 allevamenti di polli da carne all’aperto (720.000 capi). In questo modo si ridurrebbe leggermente l’area dove gli avicoli devono essere allevati al chiuso ma contemporaneamente verrebbe sottostimato il rischio di introduzione, con conseguente aumento di diventare focolaio per queste aziende.

Per una valutazione complessiva dell’impatto della misura di divieto di allevamento di pollame all’aperto devono però essere considerate anche le conseguenze economiche di un’eventuale nuova epidemia di AI, che potrebbe coinvolgere non solo gli allevamenti all’aperto ma anche altri ad essi collegati epidemiologicamente o per vicinanza geografica.

I soli costi diretti, legati alle misure adottate nei focolai del 2013 e 2016 e indennizzati dallo Stato, prevenibili con una misura di divieto di allevamento all’aperto, sono stati pari a 11.641.689 € nell’epidemia del 2013 e a 132.080 € nel 2016. A questi devono poi essere aggiunti i costi indiretti, in parte già riconosciuti agli allevatori e in parte non facilmente quantificabili, perché legati all’impatto che le epidemie hanno sulla commercializzazione dei prodotti, in particolare per quanto riguarda i blocchi delle esportazioni verso alcuni paesi terzi.

Infine devono essere considerati anche i costi del Servizio Sanitario Nazionale in termini di attività degli operatori per controlli straordinari, gestione del sistema delle deroghe ai divieti di movimentazione di animali e prodotti dalle zone di restrizione, interventi nei focolai, ecc.

## **CONCLUSIONI**

Considerato l’elevato costo dei focolai di influenza aviaria e tenuto conto che la loro prevenzione non è motivata solo da ragioni di tipo economico, per la sanità pubblica è sicuramente preferibile limitare l’allevamento all’aperto alle zone non a rischio (ad esempio nelle aree collinari distanti da zone umide), operazione che potrebbe essere accompagnata da misure di sostegno per gli allevatori interessati.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bonfanti L, Monne I, Tamba M, Santucci U, Massi P, Patregnani T, Loli Piccolomini L, Natalini S, Ferri G, Cattoli G, Marangon S, “Highly pathogenic H7N7 avian influenza in Italy.” *Vet. Rec.*, 174, 382. doi: 10.1136/vr.102202, 2014.
2. Bouwstra R, Gonzales JL, de Wit S, Stahl G, Fouchier RAM, Elbers ARW, “Risk for Low Pathogenicity Avian Influenza Virus on Poultry Farms, the Netherlands, 2007–2013”, *Emerging Infectious Diseases* 23, n. 9, DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2309.170276>, 2017.
3. Comin A, Stegeman A, Klinkenberg D, Busani L, Marangon S, “Design and result of an intensive monitoring programme for avian influenza during four epidemics in northern Italy.” *Zoonoses Public Health*, 58, 244-251, 2011.

4. De Marco MA, Foni E, Campitelli L, Delogu M, Raffini E, Chiapponi C, Barigazzi G, Cordioli P, Di Trani L, Donatelli I, “Influenza virus circulation in wild aquatic birds in Italy during H5N2 and H7N1 poultry epidemic periods (1998 to 2000).” *Avian Path.*, 34(6), 480-485, 2015.
5. Galletti G, Santi A, Guberti V, Paternoster G, Licata E, Loli Piccolomini L, Procopio A, Tamba M, “A method to identify the areas at risk for the introduction of avian influenza virus into poultry flocks through direct contact with wild ducks.” *Transbound Emerg Dis*;1–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.12838>, 2018.
6. Guberti V, Scremin M, Busani L, Bonfanti L, Terregino C, “A Simulation Model for Low-Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Dabbling Ducks in Europe.” *Avian Path.* 51:275–278, 2017.
7. Mulatti P, Zecchin B, Monne I, Vieira JT, Dorotea T, Terregino C, Lorenzetto M, Loli Piccolomini L, Santi A, Massi P, Bonfanti L, Marangon S, “H7N7 highly pathogenic avian influenza in poultry farms in Italy in 2016.” *Avian Diseases*, 2017 <https://doi.org/10.1637/11540-112516-Case.1>





## **INDICE DEGLI AUTORI**

Agnoletti F. 97  
 Alastra G. 131  
 Andreatta S. 97  
 Andreopoulou M. 121  
 Apostolakos I. 87, 161  
  
 Bano L. 97, 105, 161  
 Benedetti V. 179  
 Berto G. 191  
 Bevilacqua A. 113  
 Bianco A. 191  
 Biarnes M. 141  
 Blanco A. 141  
 Bonfanti L. 105  
 Borrelli L. 203  
 Boscarato M. 153  
 Bottinelli M. 93  
 Brunetta R. 97, 105  
  
 Camarda A. 113  
 Canziani S. 185  
 Capello K. 105  
 Carraro L. 161  
 Catania S. 23, 75, 93, 97, 105, 153, 173  
 Catelli E. 131, 135, 141, 147, 167  
 Caucci C. 105  
 Cecchinato M. 121, 141, 147, 167, 191  
 Chaligiannis I. 121  
 Circella E. 113  
 Cocchi M. 97  
 Cocciolo G. 113  
 Cuccato M. 87  
  
 Dalla Costa A. 105  
 D'Este L. 97  
 Di Martino G. 105  
 Di Nardo S. 207  
 Dipineto L. 203  
 Drigo I. 97  
 Drigo M. 191  
  
 Faccin F. 185  
 Fasolato L. 87  
 Felice V. 131, 135, 141, 147, 167  
 Ferrarress 87  
 Ferrarresso J. 87  
 Ferrari C. 77  
 Fincato A. 153  
 Fiorentini L. 147, 179  
 Fioretti A. 203  
 Franzo G. 121, 141, 167, 191  
 Fregnani G. 179  
  
 Galletti G. 207  
 Gargiulo A. 203  
 Giangaspero A. 113  
 Gobbo F. 105, 153, 173  
 Gradoni L. 113  
  
 Heckman D. 67  
  
 Koutoulis K.C. 121, 191  
  
 Lavazza A. 185  
 Legnardi M. 121, 141, 191

Lelli D. 185  
Leotti G. 179  
Loli Piccolomini L. 207  
Lupini C. 131, 135, 141, 147, 167

Mainenti M. 93  
Martini M. 167  
Massi P. 33, 147, 179  
Mazzolini E. 97  
Mescolin G. 131  
Mescolini G. 135, 141, 147, 167  
Moreno A. 185  
Moronato M.L. 105, 153, 173

Ostanello F. 179

Pace A. 203  
Paladino A. 93  
Parigi M. 179  
Paulet P. 191  
Pedicone R. 73  
Piccirillo A. 87, 161  
Pozzato N. 93, 97  
Prentza Z. 121  
Previtera I. 113  
Procopio A. 207

Quaglia G. 135

Ramon G. 191  
Rizzo R. 87  
Romanelli C. 207  
Russo T.P. 203

Santi A. 207  
Silveira F. 135, 141, 147, 167  
Silveria F. 131  
Sozzi E. 185  
Stefani A.L. 105  
Sturaro A. 173

Terregino C. 21, 167  
Tonellato F. R. 173  
Tonellato F.R. 153  
Tosi G. 33, 147, 179  
Trevisiol K. 97  
Trogu T. 185  
Tucciarone C.M. 121, 141, 167, 191

Varriale L. 203

Zago M. 87  
Zanardello C. 93, 173  
Zandonà L. 97, 105, 161

# Qualità e Sicurezza

# Fatro

la salute animale per la salute dell'uomo



*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](http://www.fatro.it) - [info@fatro.it](mailto:info@fatro.it)



# Salite a bordo di HIPRACOX®

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



## Il vostro piano di rotazione annuale contro la coccidiosi



**HIPRACOX BROILERS®**, Sospensione orale per polli. **Composizione per dose (0,007 ml):** *Eimeria acervulina* ceppo 003, 300-390 oocisti sporulate; *Eimeria maxima* ceppo 013, 200-260 oocisti sporulate; *Eimeria mitis* ceppo 006, 300-390 oocisti sporulate; *Eimeria praecox* ceppo 007, 300-390 oocisti sporulate ed *Eimeria tenella* ceppo 004, 250-325 oocisti sporulate. **Indicazioni:** polli da ingrasso: per un'immunizzazione attiva al fine di ridurre la colonizzazione intestinale, le lesioni intestinali e i segni clinici di coccidiosi causata da *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* ed *Eimeria tenella*. **Via di somministrazione:** orale, mediante nebulizzazione a goccia grossa. Dopo la vaccinazione, collocare i polli sul terreno con lettiera e continuare le consuete pratiche di produzione. Utilizzare unicamente l'agente colorante fornito. **Posologia:** polli da ingrasso: 1 dose (0,007 ml di vaccino + 0,020 ml di agente colorante)/pulcino di 1 giorno di età. Preparare dapprima la soluzione dell'agente colorante. È necessario un contenitore adeguato, pulito e con capacità sufficiente (rispettivamente da 287 ml o 1.435 ml di capacità per ciascun flacone da 1.000 o 5.000 dosi). Aggiungere dell'acqua a temperatura ambiente (rispettivamente 260 ml o 1.300 ml di acqua per ciascun flacone da 1.000 o 5.000 dosi). Agitare energicamente il flacone dell'agente colorante. Aggiungerlo all'acqua e agitare delicatamente sino ad ottenere una soluzione omogenea. Agitare energicamente il flacone di vaccino. Aggiungerlo alla miscela e agitare delicatamente sino ad ottenere una sospensione omogenea. Collocare la sospensione vaccinale preparata nel dispositivo. La sospensione vaccinale viene somministrata mediante nebulizzazione, erogando 25 ml per ogni 100 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 vaccinazione dotata alle oocisti. Conservare il vaccino ad una temperatura compresa tra +2 e +8 °C, evitandone il congelamento. Conservare l'agente colorante ad una temperatura inferiore a +25 °C. Non congelare. Il vaccino deve essere usato immediatamente dopo l'apertura e le dosi non utilizzate devono essere scartate. Il periodo di validità dopo la dissoluzione non deve superare le 10 ore. **Presentazione:** flacone da 1.000 dosi + agente colorante. Flacone da 5.000 dosi + agente colorante. **Numero dell'autorizzazione all'immissione in commercio:** A.I.C. nr. 103965024, A.I.C. nr. 103965012, A.I.C. nr. 103965087 e A.I.C. nr. 103965075. **Titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio:** LABORATORIOS HIPRA, S.A., Avda. la Selva, 135, 17170 Amer (Girona) Spagna Tel.: (+34) 972 430660 - Fax: (+34) 972 430661. **Rappresentante locale:** Hipra Italia, S.R.L., Via Franciacorta n° 74, 25038 Rovato (Brescia), ITALIA. **Condizioni di fornitura:** medicinale veterinario soggetto a prescrizione. Usare i medicinali responsabilmente.

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

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



# B-Act<sup>®</sup>

## Protezione mirata

- Un unico ceppo probiotico
- Attivo contro le *Clostridiaceae*
- Stabile durante la pellettatura e la digestione

Contatto per l'Italia: Dr. Marco Saggiorato | Tel + 39 335 59 71 487 | [marco.saggiorato@huvepharma.com](mailto:marco.saggiorato@huvepharma.com)



VETERINARY PHARMACEUTICALS  
AND VACCINES

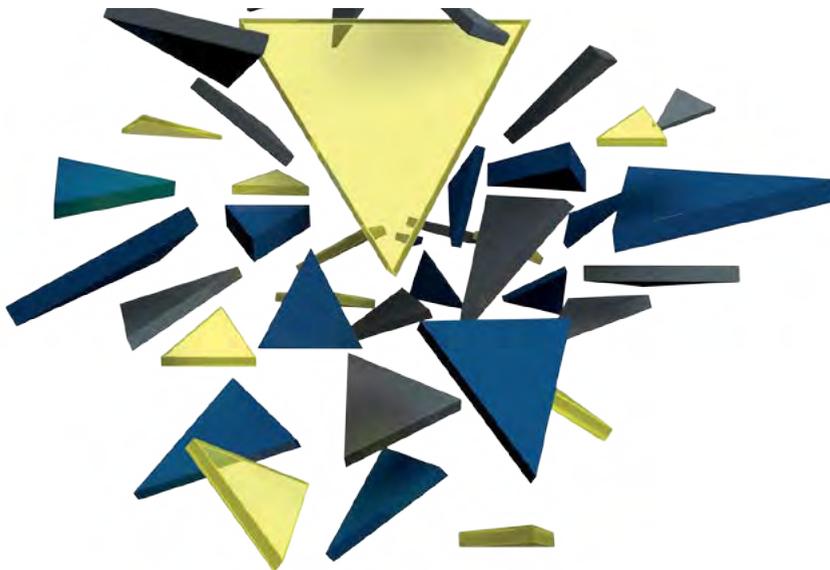
a brand of

vaxxxinova

## POULTRY

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





# 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 reinfestazione\*.

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



**LA RIVOLUZIONE NEL CONTROLLO  
DEL PIDOCCHIO ROSSO!**

220

Materiale riservato ai sigg. Medici Veterinari e Farmacisti.  
Per maggiori informazioni sul prodotto, consultare il foglietto illustrativo/RCP.

 **MSD**  
Animal Health

# 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 Agosto 2018  
da La Ducale Srl - Parma

