



chemifarma



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE - ATTI del LVIII Convegno Annuale - IV Simposio Scientifico



**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 2019



LVIII CONVEGNO ANNUALE IV SIMPOSIO SCIENTIFICO

Forlì (FC), 28-29 Marzo 2019
Bologna (BO), 22 Novembre 2019

In copertina: **“Pollaio”** - Nicoletta Belletti
www.bellettinicoletta.it

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2019**

**Forlì (FC), 28-29 Marzo 2019
Bologna (BO), 22 Novembre 2019**



INDICE

Prefazione pag. 17

ATTI DEL LVIII CONVEGNO ANNUALE

Forlì (FC), 28-29 Marzo 2019

INCONTRO

***“Problematiche sanitarie rilevate nel settore avicolo durante il 2018.
Condivisione dei casi per un costante e continuo aggiornamento”***

- INFESTAZIONE DA TENIA IN RIPRODUTTORI PESANTI
Battistoni F. pag. 21
- ALCUNI CASI CLINICI RILEVATI NEGLI ULTIMI MESI
Tosi G., Fiorentini L., Massi P., Parigi M. pag. 25
- DRASTICA RIDUZIONE DELLA SCHIUDIBILITÀ IN RIPRODUTTORI PESANTI
Facchetti G. pag. 31
- EPISODI DI *BLACK PROVENTRICULUS* IN BROILER COMMERCIALI
Brunetta R. pag. 35
- CASI CLINICI DA *SALMONELLA* HESSAREK IN STORNI NEL NORD ITALIA
*Trogu T., Salogni C., D’Incau M., Gaffuri A., Rosignoli C., Gibelli L., Lavazza A.,
Moreno A.* pag. 39
- ALTERAZIONI DEAMBULATORIE NEL BROILER: UN SINTOMO INTERESSANTE
PER UNA MIGLIORE SELEZIONE DEL CAMPIONE
Paladino A., Bottinelli M., Vesentini G., Picchi M., Catania S. pag. 43
- QUANDO L’ISTOPATIA DIVENTA FONDAMENTALE NELLA DIGNOSI
Zanardello C. pag. 45
- *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* E *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE*:
SOLO PER NON DIMENTICARE QUANDO SOSPETTARLI
Bottinelli M., Paladino A., Catania S. pag. 49

- SETTORE GALLINA FARAONA: ALCUNI CASI COME UTILI SPUNTI PER UNA DISCUSSIONE DIAGNOSTICA
Catania S., Bottinelli M., Marcolin R., Mantovani C., Paladino A. pag. 51
- MASSIVA INFESTAZIONE DA *DERMANYSSUS GALLINAE* IN UN ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE
Camarda A., Circella E. pag. 53
- L'UTILIZZO DI ACIDI ORGANICI E DERIVATI DI ERBE OFFICINALI PER CONTRASTARE L'AZIONE DI UN CEppo DI *ESCHERICHIA COLI* MULTI-RESISTENTE AGLI ANTIBIOTICI IN GALLINE OVAIOLE
Stamilla A., Messina A. pag. 55

1st Joint Meeting

*organized by
Società Italiana di Patologia Aviare &
Associazione Scientifica di Avicoltura*

“Microbiota: Perspectives and Applications in Poultry Production Chain”

- MICROBIOME-HOST: A COMPLEX TRANSGENOMIC INTERACTION
Brigidi P. pag. 59
- REVEALING CURRENT TRENDS ON DIETARY INTERVENTIONS IN BROILER CHICKENS AND ITS GUT MICROBIOTA
Borda-Molina D., Rodehutsord M., Camarinha-Silva A. pag. 65
- SEQUENCING STRATEGIES TO INVESTIGATE THE DYNAMICS OF MICROBIAL COMMUNITIES IN POULTRY: STATE OF ART AND FUTURE OPPORTUNITIES
Manfreda G., De Cesare A. pag. 73
- FIELD EXPERIENCE ON THE USE OF A MULTI-SPECIES SYNBIOTIC ON GUT HEALTH AND PRODUCTION PARAMETERS IN BROILER BREEDERS AND THEIR PROGENY
Prentza Z., Franzo G., Castellone F., Cecchinato M., Koutoulis K. pag. 81
- HOW CAN PROBIOTICS AFFECT BIRDS AND THEIR MICROBIOME IN COMMERCIAL POULTRY PRODUCTION?
Petri D. pag. 83

ATTI DEL IV SIMPOSIO SCIENTIFICO SIPA

Bologna, 22 Novembre 2019

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

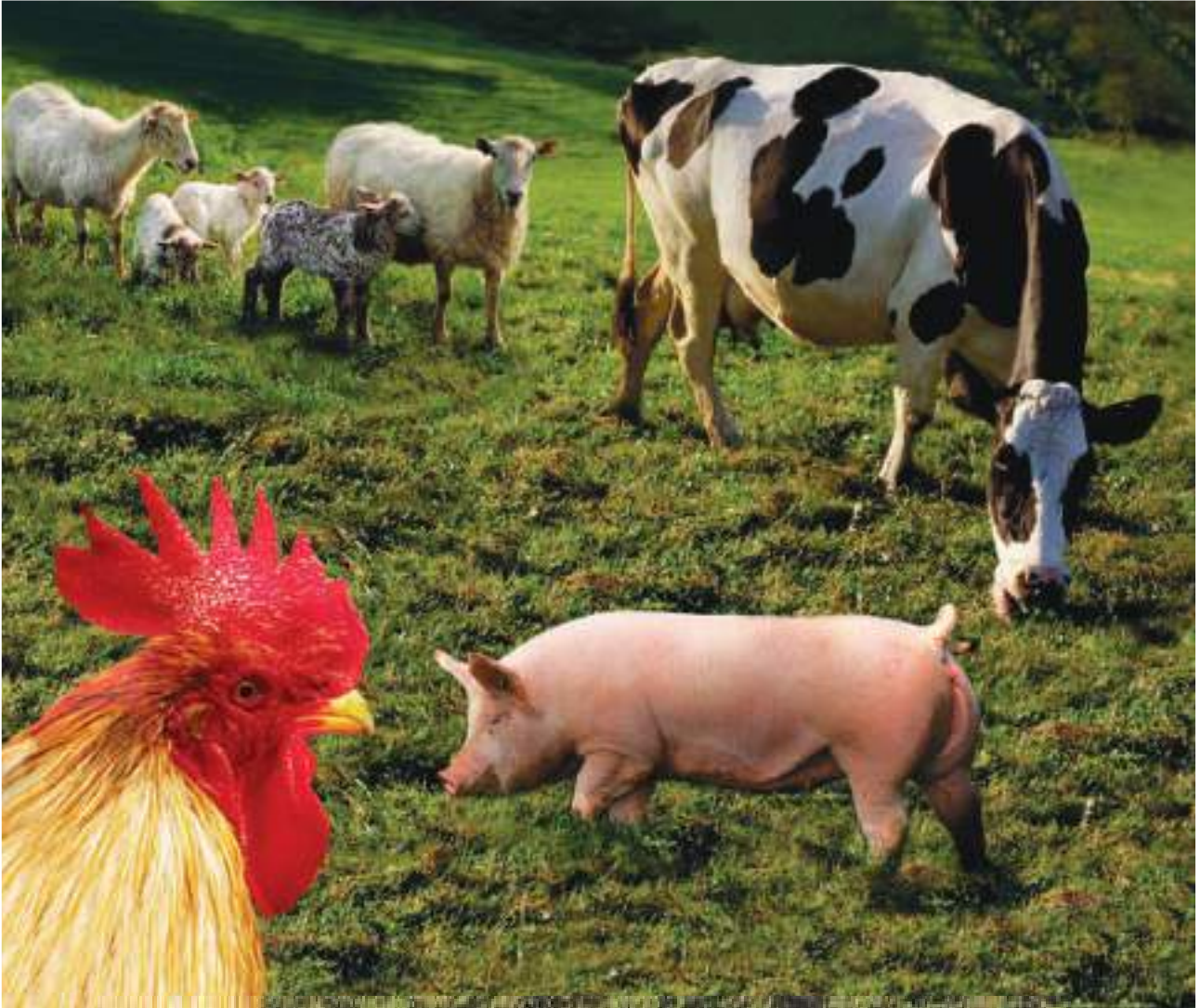
- ESPERIENZE DI CAMPO DOPO SOMMINISTRAZIONE DI UN VACCINO BATTERICO E COLI VIVO
Alberti S., Cookson K., Weber R. pag. 89
- SORVEGLIANZA ATTIVA PER INFLUENZA AVIARIA NEI VOLATILI SELVATICI NEL NORDEST ITALIA: risultati attività 2017-2018
Azzolini A., Fornasiero D., Scolamacchia F., Gobbo F., Salviato A., Cunial G., Dalla Costa A., Di Martino G., Terregino C., Mulatti P. pag. 91
- VACCINAZIONE NEWCASTLE: NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO E PROSPETTIVE FUTURE
Boldini S., Russo E., Fregnani G., Tosi G., Beoni M., Fiorentini L., Magrini M., Trevisani G., Parigi M. pag. 99
- LA DIETA A BASE DI *HERMETIA ILLUCENS* MODULA IL MICROBIOTA INTESTINALE, LA PRODUZIONE DI SCFA E LA SAZIETÀ VIA GLP-1 NELLE GALLINE OVAIOLE
Borrelli L., Dipineto L., Aceto S., Coretti L., Bovera F., Valoroso M. C., Pace A., Varriale L., Russo T. P., Santaniello A., Menna L. F., Fioretti A. pag. 105
- AGGIORNAMENTI SULLA VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE IN CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ISOLATI NEL SETTORE AVICOLO
Bottinelli M., Fincato A., Picchi M., Alessandri G., Ceoletta A., Paladino A., Catania S. pag. 109
- CONFERMA SPERIMENTALE DELLA TRASMISSIONE VETTORIALE DELLA TIFOSI AVIARE MEDIATA DA *DERMANYSSUS GALLINAE*
Cocciolo G., Circella E., Pugliese N., Lupini C., Mescolini G., Zoller H., Borchert-Stuhlträger M., Thomas E., Catelli E., Camarda A. pag. 113
- EVOLUZIONE DEL GENOTIPO QX IN PRESENZA DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI
Franzo G., Legnardi M., Tucciarone C.M., Drigo M., Martini M., Cecchinato M. pag. 119
- SINERGIA TRA ANTIBIOTICI CONVENZIONALI E ANTIMICROBICI NATURALI CONTRO *ESCHERICHIA COLI*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ED *ENTEROCOCCUS CECORUM*
Giovagnoni G., Tugnoli B., Piva A., Grilli E. pag. 127

- A/H1N1PDM(09) IN TACCHINI DA RIPRODUZIONE
Gobbo F., Zecchin B., Canevaro A., Zanardello C., Scolamacchia F., Bonfante F., Terregino C. pag. 133
- IMPATTO DELLE STRATEGIE VACCINALI SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV) NEL CONTESTO ITALIANO
Legnardi M., Franzo G., Tucciarone C. M., Drigo M., Cecchinato M. pag. 139
- RIDUZIONE DELLA PRESSIONE INFETTIVA DEL VIRUS DELL'ENTERITE EMORRAGICA A SEGUITO DELL'INTRODUZIONE DEL VACCINO VIVO ATTENUATO NELL'ALLEVAMENTO DEL TACCHINO
Lupini C., Mescolini G., Quaglia G., Benedetti V., Volorio A., Catelli E..... pag. 145
- GENOTIPIZZAZIONE DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* TRAMITE METODICA MLST: RISULTATI PRELIMINARI SU CAMPIONI ISOLATI DA IZSVE
Matucci A., Stefani E., Tondo A., Dal Prà M., Quaranta E., Paladino A., Bekő K., Gyuranecz M., Catania S. pag. 149
- MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK IN ALLEVAMENTI DI BROILER E DI RIPRODUTTORI PESANTI
Mescolini G., Lupini C., Quaglia G., Berto G., Tovani A., Ceroni S., Muccioli F., Catelli E. pag. 159
- EFFETTI DELL'AGGIUNTA DI *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* SULLE PERFORMANCE E SULLE CARATTERISTICHE DELLE UOVA DI GALLINE OVAIOLE ALIMENTATE CON MANGIMI A DIFFERENTI DENSITA' DI NUTRIENTI
Mikulski D., Jankowski J., Mikulska M., Ligabue M., Demey V. pag. 167
- VALUTAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI*, ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE ANTIBIOTIC FREE, BIOLOGICI E AL MACELLO
Musa L., Casagrande Proietti P., Bellucci S., Branciarri R., Menchetti L., Roila R., Giannone A., Franciosini M.P..... pag. 173
- PROFILO DI ESPRESSIONE DI CITOCHINE INFIAMMATORIE NELLA MEMBRANA CORION ALLANTOIDEA DI EMBRIONI DI POLLO SPF: RISULTATI PRELIMINARI
Parigi M., Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Turri V. pag. 183
- ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI CIRCOLANTI IN ITALIA
Quaglia G., Mescolini G., Catelli E., Berto G., Muccioli F., Lupini C..... pag. 189

- VARIAZIONE DEI PARAMETRI IMMUNOLOGICI IN BROILER SPF A SEGUITO DELL'APPLICAZIONE DI DUE DIVERSI PROGRAMMI VACCINALI PER MALATTIA DI GUMBORO
Russo E., Quaglia G., Mescolini G., Salaroli R., Catelli E., Boldini S., Forni M., Lupini C. pag. 197
- AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* E *DERMANYSSUS GALLINAE*. UNA RELAZIONE ANCORA DA SCOPRIRE
Schiavone A., Pugliese N., Circella E., Sangiorgi A., Magrini M., Camarda A. pag. 203
- DIFFUSIONE DEI GENI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA (ARGS) IN ALLEVAMENTI AVICOLI DEL CENTRO ITALIA
Smoglica C., Di Francesco C.E., Profeta F., Muhammad F., Di Giannatale E., Toscani T., Marsilio F. pag. 209
- CO-INFEZIONE DI AVIAN ORTHOREOVIRUS E CHICKEN ASTROVIRUS IN BROILER: DIAGNOSI IN REAL-TIME PCR E RILIEVI ISTOLOGICI
Stamilla A., Messina A., Sallemi S., Lanza M., Puleio R., Loria G.R., Cascone G., Antoci F. pag. 215
- DIFFUSIONE E GENOTIPIZZAZIONE DI *CORONAVIRUS* NEGLI UCCELLI SELVATICI
Trogu T., Canziani S., Parisio G., Lelli D., Sozzi E., Barbieri I., Grilli G., Chiari M., Lavazza A., Moreno A. pag. 221
- STUDIO DELL'EFFETTO FILIERA SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI QX IN ITALIA
Tucciarone C.M., Franzo G., Legnardi M., Massi P., Tosi G., Trogu T., Moreno A., Ceruti R., Pesente P., Ortali G., Gavazzi L., Cecchinato M. pag. 229
- MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO PER STUDIARE LA COCCIDIOSI AVIARIA *IN VITRO*
Tugnoli B., Sangiovanni M., Ghiselli F., Felici M., Fiorentini L., Parigi M., Tosi G., Piva A., Grilli E., Massi P. pag. 237

POSTER

- EFFICACIA IN CAMPO DELLA VACCINAZIONE PER IL CONTROLLO DELLE ALTERAZIONI APICALI DELL'UOVO CAUSATE DA *MYCOPLASMA SYNOVIAE*
Bassi E., Burzoni G., Careno S. pag. 247
- **INDICE DEGLI AUTORI**..... **pag. 253**



**La soluzione giusta
per ogni **specie**
di problema**

NUMEROVERDE
800-015121

www.vetclub.it



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



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!

NOVAMUNE[®]



STOP

THE GUMBORO CYCLE

IBD CONTROL FROM THE HATCHERY
ALLOWS YOU TO RE-THINK YOUR
VACCINATION PROGRAM

Ceva Salute Animale S.p.A.
Viale Colleoni 15
20864 Agrate Brianza (MB)
www.ceva-italia.it





- EFFICACIA ANCHE SENZA ANTIBIOTICI -



FitoCLO'
HS



FitoRESP



FitoCSC

20 ANNI DI ESPERIENZA
NELLA CURA DELLA SALUTE DEGLI ANIMALI
CON SOLUZIONI NATURALI ALTERNATIVE AGLI ANTIBIOTICI



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



UNA FAMIGLIA.
UN PROPOSITO.

HALAMID

IL DISINFETTANTE UNIVERSALE

Halamid®: la soluzione che non trova resistenze.

La biosicurezza inizia da una disinfezione efficace.

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

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

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

Avere cura è molto più che curare.

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

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





Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2019 sono realizzate grazie al contributo di:

• AVIAGEN Italia •

• BAYER Sanità animale •

• BOEHRINGER INGELHEIM •

• CEVA Salute animale •

• CHEMIFARMA •

• COBB •

• DOX AL ITALIA •

• ELANCO Animal Health •

• FATRO •

• HIPRA •

• HUVEPHARMA •

• MSD Animal Health •

• ZOETIS Italia •

PREFAZIONE

Legnaro (PD), 03 settembre 2019

Come consuetudine, pubblichiamo gli Atti del LVIII Convegno nazionale e del IV Simposio Scientifico. Il convegno nazionale, tenutosi a Forlì in concomitanza con la 51° edizione della Fiera Avicola, il 29 marzo ha avuto come tema il “Microbiota: prospettive e applicazioni nell’allevamento avicolo” con relatori esperti dell’argomento sia nazionali che internazionali che desidero ringraziare per l’elevato valore scientifico degli interventi. Questo evento è stato realizzato in sinergia con l’associazione scientifica di Avicoltura e desidero a tal proposito ringraziarne il Presidente e il segretario, rispettivamente il Prof. Martino Cassandro e il Prof. Massiliano Petracci e sottolineare come questa iniziativa non sia di carattere estemporaneo ma che anzi sia solo l’inizio di future collaborazioni per cercare di fornire una formazione completa e moderna agli addetti del settore avicolo.

Il 28 marzo sono state presentate da alcuni nostri soci le problematiche sanitarie rilevate nel settore avicolo durante il 2018 con un format nuovo che ha previsto per la prima volta la condivisione di casi clinici, con il coordinamento dal Dott. Salvo Catania che ringrazio per l’aiuto e il tempo dedicato. Mi auguro che questa iniziativa possa continuare e strutturarsi nel tempo.

Sono molto fiducioso sul futuro della nostra società guardando al numero di relazioni e di gruppi di ricerca crescenti negli anni, nonché di giovani ricercatori, presenti con i propri lavori scientifici al nostro Simposio Scientifico che si terrà per la quarta edizione il 22 Novembre 2019 presso Hotel Savoia Regency di Bologna.

Dato il cambio avvenuto dal 2019 del Consiglio direttivo e del presidente, desidero ringraziare il Prof. Guido Grilli per l’enorme e prezioso lavoro svolto per la nostra società e per il supporto e i consigli che mi hanno accompagnato in questa prima fase del mio mandato e desidero esprimere inoltre un ringraziamento anche ai consiglieri non più presenti nel Direttivo.

Vorrei infine ricordarvi come la nostra società abbia ricevuto l’onore di ospitare il convegno mondiale del 2021 a Verona e in vista di questo prestigioso impegno chiedo a tutti voi soci di supportarne a vario titolo l’organizzazione e di contribuire alla pubblicizzazione dell’evento nei vostri ambiti.

Un caro saluto,

Prof. Mattia Cecchinato
Presidente SIPA

ATTI DEL LVIII CONVEGNO ANNUALE

INCONTRO

**“Problematiche sanitarie rilevate
nel settore avicolo durante il 2018.
Condivisione dei casi per un
costante e continuo aggiornamento”**

Forlì (FC), 28-29 Marzo 2019



INFESTAZIONE DA TENIA IN RIPRODUTTORI PESANTI

Battistoni F.

Medico Veterinario di filiera, Forlì

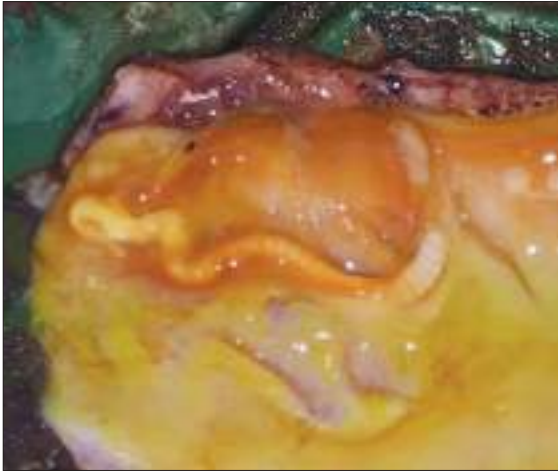
Infestazione da tenia

- Allevamento da riproduzione, ross308, 27 w
- 6 capannoni , 2 pulcinaie
- Allertato perché mortalità anomala
- inizialmente colpiti solo animali provenienti da 1 pulcinaia .
- Zona perineale imbrattata e presenza di prolassi rettali

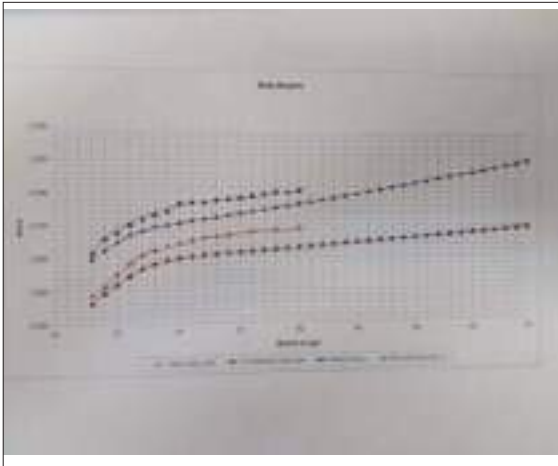


- Presenza di parassiti intestinale nel piccolo intestino.
- All'inizio presenza di tenie e successivamente anche presenza di ascaridi.





- Probabilmente si tratta di tenia Raillietina Cesticillus,(vista la lunghezza e la localizzazione) parassita appartenente alla classe dei Cestodi
- Cestode aviare può arrivare a 15 cm
- Lo scolice si immerge profondamente nella mucosa del duodeno e digiuno dell'ospite
- Generalmente il parassita è abbastanza innocuo e non provoca lesioni gravi.



- Trattati con levamisolo 1ml/8-10 kg pv 1 gg
- Ripetuto dopo 21 gg

- Dopo 1 mese dal trattamento su 10 animali controllati, 2 presentavano ancora infestazione da tenie e dopo 2 mesi, 2 animali presentavano infestazione di ascaridi.





PREVENZIONE






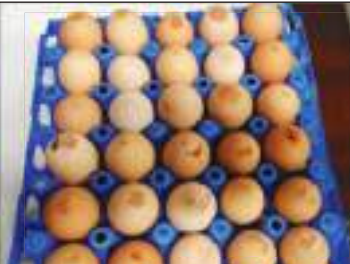
- Ospite intermedio scarafaggi(*alpheobius diaperinus*) o mosche domestiche
- Lotta ai coleotteri con prodotti specifici
- Pirodisinfezione



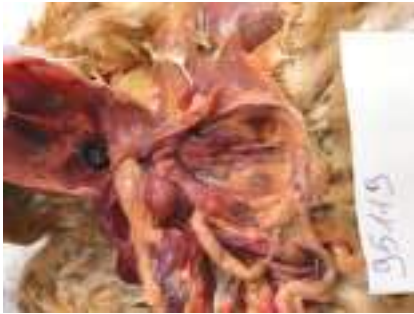
ALCUNI CASI CLINICI RILEVATI NEGLI ULTIMI MESI

Tosi G., Fiorentini L., Massi P., Parigi M.

IZSLER, Sezione di Forlì

 <p>Alcuni casi clinici rilevati negli ultimi mesi Giovanni Tosi, Laura Fiorentini, Paola Massi, Maria Parigi IZSLER Forlì</p> <p>LVIII Convegno Nazionale SIPA Forlì, 28 marzo 2019</p>	<p>Spondilite batterica</p> 
<p>Spondilite batterica</p> 	<p>Spondilite batterica</p> 
<p>Spondilite batterica</p> 	<p>IBV D274 in ovaiole</p> 

Nefrite in pollastre



Lesioni da tricoteceni



Lesioni da tricoteceni



Histomoniasi



Histomoniasi



Histomoniasi



Histomoniasi



Histomoniasi



Histomoniasi



Dermatite gangrenosa



Intestinal dilatation in organic layers



Fig. 1. Dilatation of the small intestine accompanied by subacute and chronic of the leishmaniasis and Sarcocystis

The Veterinary Record, July 9, 2000

Intestinal Dilatation in Layers



Intestinal Dilatation in Layers



Intestinal Dilatation in Layers



Intestinal dilatation in layers

Segnalazioni da Sud America, Francia, Italia

Non legata ad un'unica linea genetica

Comparsa a 25-30 settimane di età

Dilatazione del tratto intermedio talvolta associata a torsione

Accorciamento dell'intestino (circa 30 cm in meno)

Enterite con infiltrazione di eosinofili

Coinvolgimento di clostridi?

Enterite necrotica in fase di pollastra

Vaiolo cutaneo in pollastre



Pox in tacchini da riproduzione



Pox in tacchini da riproduzione



Pox sulla MCA



Sindrome neoplastica in starne



Sindrome neoplastica in starne



Mortalità in riproduttori pesanti



Mortalità in riproduttori pesanti






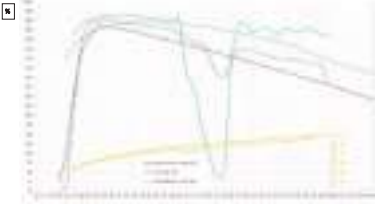




DRASTICA RIDUZIONE DELLA SCHIUDIBILITÀ IN RIPRODUTTORI PESANTI

Facchetti G.

Medico Veterinario di filiera, Brescia

 <h2>Drastica Riduzione della schiudibilità in Riproduttori pesanti</h2> <p>Giuseppe Facchetti, Medico Veterinario di filiera, Brescia</p> <p>LVIII Convegno Nazionale SIPA 28-29 Marzo 2019, Forlì</p>	<h2>Introduzione</h2> <ul style="list-style-type: none">• Periodo: Luglio - Agosto 2018• Provincia di Brescia• Riproduttori pesanti Ross 308• 5 Gruppi di riproduttori da 10.000 a 20.000 animali 
<h2>Valutazione Clinica</h2> <p><u>Allevamento: Prime 4 settimane</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Aumento mortalità da 0,2 % a 0,5% a settimana• Calo produzione uova dal 0,7% al 3% a settimana• Calo peso uovo (- 2 gr)• Assenza di manifestazioni cliniche in allevamento 	<h2>Valutazione Clinica</h2> <p><u>Allevamento: 5 - 8 settimana</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Mantenimento mortalità a 0,5% a settimana• Calo produzione uova dal 3% al 6% a settimana• Lieve diminuzione vitalità gruppo• Aumento tempo assunzione alimento• Assenza di uova a terra• Negatività al batteriologico e IA 
<h2>Valutazione Clinica</h2> <p><u>Incubatoio</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Diminuzione marcata della % schiusa• 39° sett - 91,5%• 40° sett - 63,4%• 41° sett - 54,4%• 42° sett - 34,7%• 43° sett - 19,7%• 44° sett - 8,3%• 45° sett - 8,2%• Diminuzione qualità Pulcino 	<h2>Dati tecnici Riproduttori</h2> 

Valutazione Clinica

Non nato

DATE INC.	DATE DEPOS.	FLOCK	AGE	% HATCH		
10/08/2018	31/07/2018	LOW	40	96,97		
%						
Not Fertilised				0,67		
Died day 1-7				1,78		
Died day 8-14				0,67		
Died day 15-19				37,11		
Ext. Pipped				2,22		
Dead/2nd class	0,44	DATE INC.	DATE DEPOS.	FLOCK	AGE	% HATCH
Gaseous eggs	0,67	24/08/2018	15/08-17/08	LOW	42	25,7
%						
Not Fertilised						0,5
Died day 1-7						0,3
Died day 8-14						0,33
Died day 15-19						50,3
Ext. Pipped						0,33
Dead/2nd class						0,5
Gaseous eggs						0,16



Diagnosi Differenziale

Mortalità Tardiva Incubatoio

- Temperatura \ Umidità di incubatrice \ Schiusa non corretta
- Danneggiamento al trasferimento
- Fumigazione eccessiva nelle schiuse
- Uova incubate a rovescio
- Perdita di acqua insufficiente

Diagnosi Differenziale

Mortalità Tardiva Allevamento

- Contaminazione
- Carenze nutritive

Analisi Alimento

Campioni per analisi :			Vitamina D3		
Matrici Mangime					
Allevamento	Lotto	Mangime	Dato teorico	Risultato	Inclusione
Tiracollo	2598	Ovaliola	3500 UI/Kg	1400	40 %
Bredina	2442	Ovaliola	3500 UI/Kg	0	0 %
Sedena	2290	Ovaliola	3500 UI/Kg	0	0 %
Cresco	2254	Preovaliola	3000 UI/Kg	0	0 %
Rovetta	2217	Pulcini	3000 UI/Kg	0	0 %
Matrici Integratore					
Tipologia	Lotto	Desaggio	Dato teorico	Risultato	Inclusione
Pollastre	5276557	1 %	300000 UI/Kg	325000	108 %
Breeder	5158146	0,50 %	700000 UI/Kg	28000	4 %
Breeder	5276559	0,50 %	700000 UI/Kg	548000	78 %

Terapia

- Sostituzione integratore

Remissione sintomi

- Produzione uova - 15 gg (Dal 60 % al 75%)
- % Schiusa - 15 gg (Dal 8,2% al 88,6%)



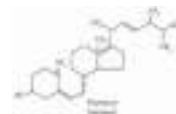
Conclusioni:

Avitaminosi D3 ha provocato:

- Riproduttore pesante:**
- Diminuzione produzione uova
 - Lieve aumento mortalità

Progenie:

- Drastica diminuzione schiudibilità
- Diminuzione qualità pulcino

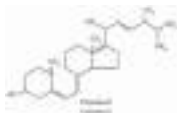


Se l'animale continua ad alimentarsi la remissione dei sintomi è rapida e completa

Conclusioni

Possono diminuire rischio:

- Fonti diverse di vitamina D3
- Brevi periodi di stoccaggio in allevamento del mangime



Grazie per l'attenzione!



14



EPISODI DI *BLACK PROVENTRICULUS* IN BROILER COMMERCIALI

Brunetta R.

IZSVe, Sezione di Treviso



Episodi di *black proventriculus* in broiler commerciali

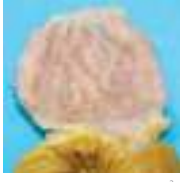
Romina Brunetta

IZSVe Sezione di Treviso

LVIII CONVEGNO NAZIONALE SIPA
Forlì, 28 Marzo 2019

Cause di proventricolite

- Proventricolite virale trasmissibile (TVP)
- Bronchite Infettiva (IBV variante Q1)
- Proventricoliti da lieviti
- Black proventriculus



2

Cos'è il Black Proventriculus?

Wang et al., 2015


- Razza colpita: Arbor Acres (Aviagen)
- Età: 3-8 gg
- Mortalità: max a 2,85 %
- Anatomia patologica
- Istologia: proventricolite necrotica
- Virologia: neg
- Batteriologia: E. coli O142
- Riproduzione sperimentale con E. coli O142:
 - ✓ ceppo isolato da proventricolo
 - ✓ ceppo isolato da camera cardiaca
 - ✓ ceppo O2 (controllo)

3

Cos'è il Black Proventriculus?

Wang et al., 2015

- Razza colpita: Arbor Acres (Aviagen)
- Età: 3-8 gg
- Mortalità: max a 2,85 %
- Anatomia patologica
- Istologia: proventricolite necrotica
- Virologia: neg
- Batteriologia: E. coli O142
- Riproduzione sperimentale con E. coli O142:
 - ✓ ceppo isolato da proventricolo
 - ✓ ceppo isolato da camera cardiaca
 - ✓ ceppo O2 (controllo)



4

I nostri casi di Black Proventriculus

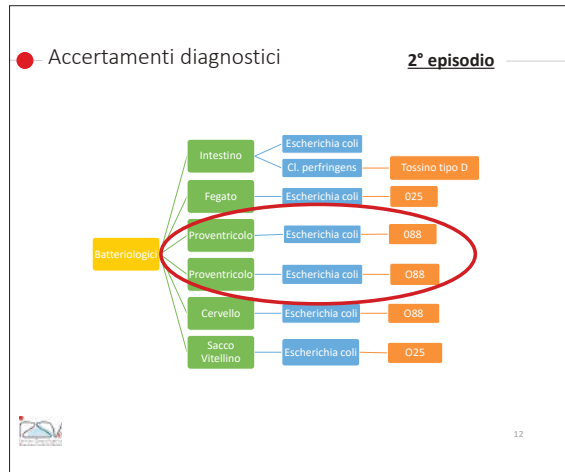
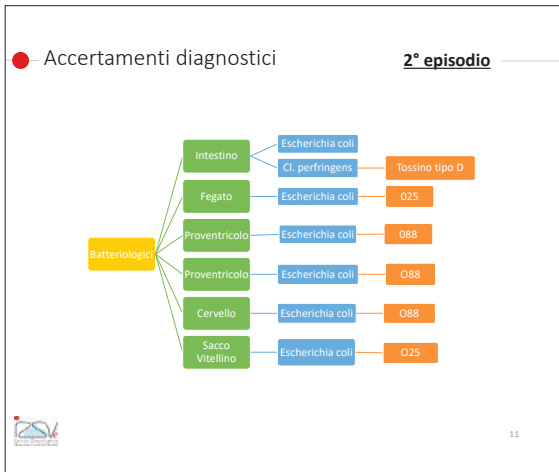
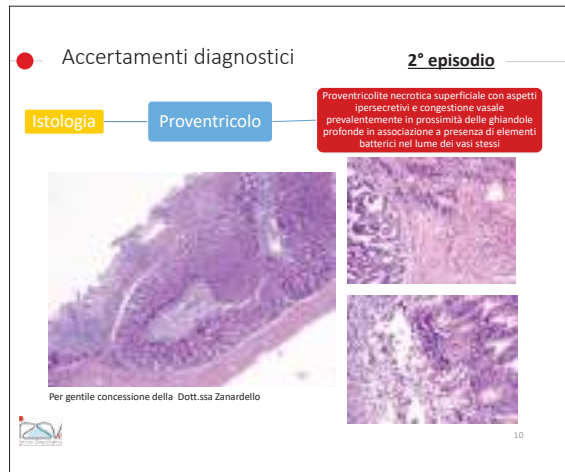
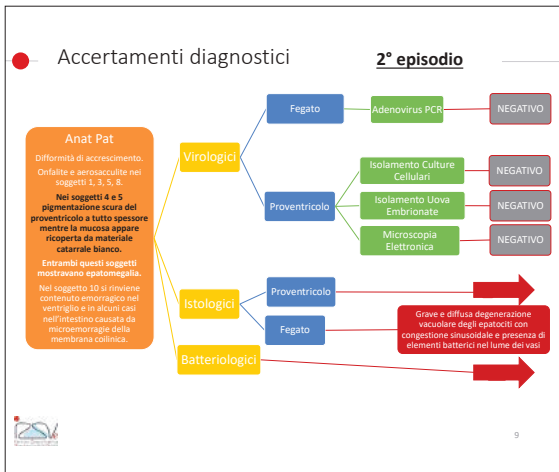
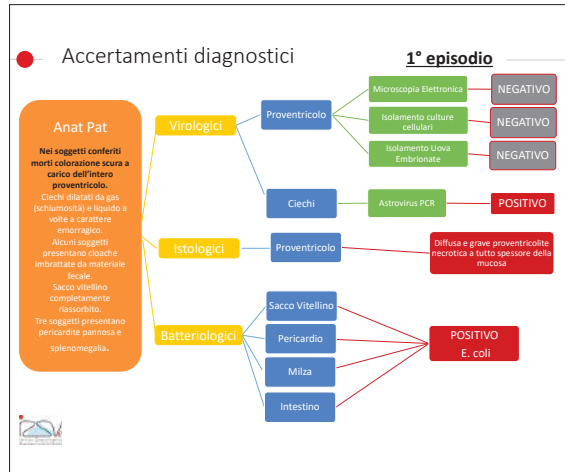
- 1° episodio
- Novembre 2013
- Pulcini Ross 308
- Sintomi: diarrea e lettiera bagnata
- Morbilità: 2%
- 2° episodio
- Gennaio 2019
- Pulcini Ross 308
- Controllo per inizio aumento mortalità post-accasamento

5

1° episodio



6



● Discussione

- A cosa è dovuta la pigmentazione?
- Come mai non la vediamo all'istologia?
- Potrebbe trattarsi di una patologia emergente?
- Caratterizzazione degli E. coli isolati per identificare fattori di virulenza, particolare tropismo, specie specificità



13



- Ringraziamenti
Dott.ssa Claudia Zanardello
Dott.ssa Silvia Deotto

Prealpi trevigiane, praterie di narcisi



Grazie per l'attenzione



CASI CLINICI DA *SALMONELLA* HESSAREK IN STORNI NEL NORD ITALIA

Trogu T., Salogni C., D'Incau M., Gaffuri A., Rosignoli C., Gibelli L., Lavazza A., Moreno A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia (Italy)

Salmonella enterica è un batterio bastoncellare, gram-negativo, flagellato, che appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il sierotipo Hessarek rappresenta un sierotipo atipico, isolato per la prima volta in Iran negli anni '50 in un corvo imperiale (*Corvus corax*) (Neel et al. 1953). Successivamente in Europa si sono verificati diversi focolai di salmonellosi causati da tale sierotipo, e decorsi in forma setticemica, a carico di alcune popolazioni di storni (*Sturnus vulgaris*) (Singer et al. 1977). In centro Italia sono stati riportati due focolai negli storni in Umbria (Magistrali et al. 2008) e in Emilia Romagna (Gelmini et al. 2010).

Nel 2018 in Nord Italia, a partire dalla metà di novembre e per circa un mese, sono stati osservati diversi fenomeni di elevata mortalità a carico delle popolazioni di storni. Le aree principalmente coinvolte riguardavano le province di Lecco, Bergamo, Brescia e Mantova, in particolar modo nella fascia compresa tra il lago di Garda e il lago d'Iseo. In totale sono state raccolte 241 carcasse di storni sia nelle aree urbanizzate sia nelle zone agricole. La maggior parte degli storni provenivano dai comuni situati in prossimità della sponda meridionale del Lago di Garda. Le carcasse sono state conferite presso le sezioni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna dove sono state sottoposte a indagine necroscopica per poter individuare le cause della morte. All'esame autoptico tutti gli storni apparivano in buone condizioni di salute, si sono riscontrati quadri di enterite, splenomegalia, epatomegalia con la presenza di piccoli focolai necrotici e petecchie emorragiche a livello epatico e renale, ed emorragie polmonari. L'esame istologico ha confermato un quadro di iperplasia dei dotti biliari ed epatite con focolai di necrosi coagulativa, infiltrazione linfocitaria e aggregati batterici. Gli epatociti presentavano una degenerazione torbido-vacuolare.

La ricerca di sostanze nocive per escludere una possibile intossicazione ha dato esito negativo. Le sostanze ricercate erano rappresentate da pesticidi, piretroidi, cianuri, zinco fosforo, metaldeide, cloralosio, stricnina, carbammati, anticoagulanti e triazine.

Gli organi prelevati in sede di necroscopia sono stati inoltre omogenati e accorpati in pool per essere sottoposti a esame virologico tramite l'utilizzo di colture cellulari (linea VERO – African green monkey kidney cells), uova embrionate, microscopia elettronica in colorazione negativa previa ultracentrifugazione. Gli stessi pool sono stati poi sottoposti a indagini molecolari con specifiche PCR per la ricerca di West Nile virus, Usutu virus, *Flavivirus*, virus dell'influenza aviaria e virus della malattia di Newcastle. Tutte le indagini virologiche sono risultate negative.

Gli organi prelevati da diversi storni sono stati contestualmente sottoposti a indagine batteriologica tramite l'utilizzo di tecniche di coltura standard. Fegato, milza

ed encefalo sono stati seminati su terreni di coltura Agar sangue e Gassner e incubati in anaerobiosi a 37°C per 24 ore. La crescita di colonie riferibili a *enterobacteriaceae* ha portato all'utilizzo di terreni e tecniche selettive per l'identificazione di *Salmonella* (ISO 17604:2015) evidenziando la natura setticemica delle lesioni riscontrate, con localizzazione primaria soprattutto a livello epatico. Le colonie di *Salmonella* sp. isolate sono state confermate dal punto di vista biochimico tramite GNA System (Microgen TM) e successivamente sierotipizzate come *Salmonella enterica* serovariante Hessarek (ISO/TR 6579-3:2014). I 17 ceppi isolati sono al momento sottoposti a genotipizzazione tramite PFGE (pulsed-field gel-electrophoresis).

Il presente caso clinico conferma l'elevata patogenicità della *Salmonella enterica* Hessarek negli storni. Il comportamento altamente gregario di questi uccelli sicuramente potrebbe facilitare la diffusione dell'infezione. Il batterio isolato è considerato specifico degli storni e solo saltuariamente in grado di provocare epidemie in altri uccelli, come ad esempio il merlo e il passero comune (Singer et al. 1977). La malattia nei mammiferi è piuttosto rara (Handeland et al. 2008; Gomez Laguna et al. 2011), e generalmente collegata a un incrementato isolamento del batterio nelle popolazioni di uccelli selvatici. Per quanto riguarda l'uomo, si registra un unico caso di infezione avvenuto nel 1977 in Israele (Singer et al. 1977). Tuttavia negli ultimi report del 2017 dell'ECDC e dell'EFSA, *S. Hessarek* non è considerata tra i serotipi dannosi per la salute umana.

Considerando le dimensioni e l'estensione del focolaio sopra descritto, sono state effettuate ulteriori indagini sulla presenza di questo microorganismo in mammiferi e uccelli rinvenuti morti nelle zone coinvolte. Nel gennaio del 2019, in provincia di Bergamo, sono stati rinvenuti e analizzati un airone cenerino (*Ardea cinerea*) che presentava le stesse lesioni anatomopatologiche riscontrate durante il focolaio, e altri 54 storni. Le analisi hanno evidenziato anche in questo caso la positività a *Salmonella enterica* serovar. Hessarek, e in uno storno è stato possibile l'isolamento in un campione di encefalo.

Questo focolaio sottolinea l'importanza del monitoraggio dello stato di salute della fauna selvatica e in particolare dell'avifauna, considerando le altissime densità che alcune specie aviarie possono raggiungere, soprattutto in ambito urbano, con conseguenti implicazioni di ordine igienico-sanitario.

BIBLIOGRAFIA

1. Gelmini L, Bassi S, Carra E, D'incau M, Fiocchi A, Sala L, Magistrali C, Ferri M, Zicavo A, Pongolini S. 2010. *Salmonella* Hessarek in starling (*Sturnus vulgaris*): diagnosis and molecular study of outbreak and collection isolates. Atti "Healthy wildlife, healthy people" 9th Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association, Vlieland (Netherlands), 13-16 settembre 2010.
2. Gomez-Laguna J, Hernandez M, Creus E, Echeita A, Otal J, Herrera-Leon S, Andr. J. Astorga. 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in freerange pigs. *Veterinary Journal* 190: 176–178.
3. Handeland K, Nesse LI, Lillehaug A, Vikøren T, Jønne Bd, Bergsjø B. 2008. Natural and experimental *Salmonella* Typhimurium infections in foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Microbiology* 132: 129–134.

4. Magistrali C, Latini M, Manuali E, Neri C, Panzieri C, Bazzucchi V, Zicavo A, Pezzotti G. 2008. Cases of salmonellosis from *S. Hessarek* in European Starling (*Sturnus vulgaris*) in the center of Italy. *Sanita` Pubblica Veterinaria* 49, [http://indice.spvet.it/arretrati/ numero-49/005.html](http://indice.spvet.it/arretrati/numero-49/005.html). Accessed December 2018
5. Neel R, Le Minor L, Kaweh M. 1953. Une nouvelle espèce de salmonella isolée chez un corbeau (*Corvus corax*): *Salmonella* Hessarek. *Annales de l'Institut Pasteur* 85: 271–274.
6. Singer Ny, Weismann Yy, Marder U. 1977. Isolation of *Salmonella* Hessarek from starlings (*Sturnus vulgaris*). *Avian Dis*, 21, 117-119, DOI: 10.2307/1589370



ALTERAZIONI DEAMBULATORIE NEL BROILER: UN SINTOMO INTERESSANTE PER UNA MIGLIORE SELEZIONE DEL CAMPIONE

Paladino A., Bottinelli M., Vesentini G., Picchi M., Catania S.

Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Laboratorio Medicina Aviare, Verona

Key words: zoppia; broiler; *Enterococcus cecorum*; approccio integrato

Le patologie dell'apparato muscolo - scheletrico hanno rappresentato, nell'ultimo anno, un capitolo importante dell'attività diagnostica di routine e, sebbene i rilievi clinici siano alquanto sfumati, esse sono in grado di comportare gravi perdite in termini di performance produttive. Pertanto, è fondamentale osservare e riconoscere tempestivamente i segni ascrivibili a tali forme morbose, nonché raccogliere tutte le informazioni anamnestiche utili, al fine di scegliere un campione, nella popolazione dei soggetti affetti, che sia realmente rappresentativo del processo patologico da sottoporre ad indagine.

Vengono presentati alcuni casi esaminati, la cui anamnesi riferiva di eventi di alterazioni deambulatorie nel broiler. Nella maggior parte di essi, i soggetti affetti mostravano segni di decubito prolungato e tentavano di aiutarsi nella deambulazione mediante l'utilizzo delle ali. Alcuni soggetti al contrario, assumevano un'andatura barcollante. In altre situazioni, a causa della dolorabilità, gli animali affetti mostravano difficoltà nell'appoggio di un arto. Nonostante la sintomatologia variegata, l'indagine anatomopatologica condotta sui cadaveri, permetteva di delineare principalmente un quadro di necrosi della cartilagine articolare a livello di epifisi prossimale del femore. Le indagini batteriologiche, in sede di lesione morfologicamente rilevata, permettevano di dimostrare la presenza di *Enterococcus cecorum*. Tali aspetti clinici ed eziologici sono stati solitamente riscontrati in soggetti di due – tre settimane di età, e sebbene in minor misura, *Enterococcus cecorum* è stato rinvenuto anche in una testa del femore di soggetti di una settimana di età, come d'altro canto già riportato in letteratura (Borst 2017). In altri casi, in gruppi di broiler con quadri sintomatologici e morfologici simili a quelli appena descritti, è stato isolato *Streptococcus gallolyticus*. In broiler tra le 5 e le 8 settimane di vita, veniva registrata una sintomatologia peculiare, con paresi - paralisi di entrambi gli arti. Tali rilievi clinici suggerivano di focalizzare l'attenzione sull'ispezione della vertebra toracica libera, dove era possibile rinvenire lesioni di osteomielite necrotica da *Enterococcus cecorum*. In allevamenti dove si registravano problematiche di zoppia, spesso veniva contestualmente riportata difformità di gruppo di grado variabile. La dolorabilità osteoarticolare infatti limita i movimenti degli animali che trovano difficoltà a raggiungere i siti di abbeveraggio e di alimentazione. Rispondere ad un quesito diagnostico diventa sempre più complesso. Un risultato laboratoristico rimane solo un dato asettico se non attinge ad un'anamnesi dettagliata ed ad un racconto oggettivo di quello che succede in campo. Il contributo nel riconoscere e segnalare un sintomo è pertanto strumento utile a facilitare il patologo nella ricerca della diagnosi. Un approccio integrato che permetta di condividere le singole competenze professionali e di

riflettere su una tematica diagnostica da più punti di vista, rappresenta un'esperienza di vicendevole arricchimento e si dimostra di grandissimo aiuto nella diagnostica delle problematiche sanitarie.

BIBLIOGRAFIA

Borst, L. B., M. M. Suyemoto, A. H. Sarsour, M. C. Harris, M. P. Martin, J. D. Strickland, E. O. Oviedo, and H. J. Barnes. Pathogenesis of Enterococcal Spondylitis Caused by *Enterococcus cecorum* in Broiler Chickens. *Vet. Pathol.* 54:61-73. 2017.

QUANDO L'ISTOPATIA DIVENTA FONDAMENTALE NELLA DIGNOSI

Zanardello C.

IZSVe, Laboratorio Istopatologia

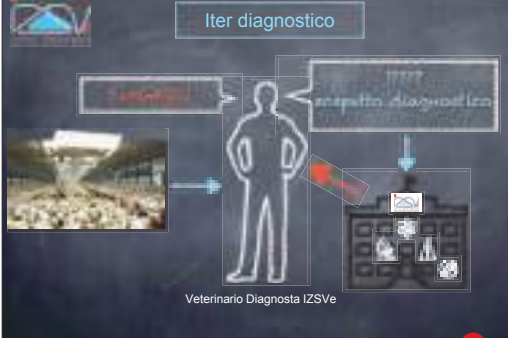
LVIII CONVEGNO ANNUALE SIPA

Quando l'istopatologia diventa fondamentale nella diagnosi:
casi clinici



Dott.ssa Claudia Zanardello
Laboratorio di Diagnostica Specialistica e Istopatologia
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Iter diagnostico

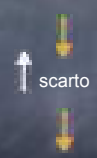


Veterinario Diagnosta IZSVe

BROILER CASO CLINICO 1

Storia clinica

Animali alla macellazione con soffiusioni emorragiche nei mm pettorali




PERDITA ECONOMICA

7 animali (25 gg) CASO CLINICO 1

Macroscopicamente

- Buono stato di idratazione e nutrizione
- Soffusioni/Petecchie emorragiche mm pettorali (bursite sternale in 3 sogg)
- Lieve congestione timica
- Deformità degli arti (estensione laterale lieve, rotazione parziale zampe su asse tibiale, fuoriuscita tendine gastrocnemio dalla normale posizione)
- Lieve tumefazione articolazioni tarsiche


CASO CLINICO 1



CASO CLINICO 1

Sospetto ?

- Mycoplasma synoviae
- Problema nutrizionale
- Anemia Infettiva del pollo





- REAL TIME PCR per Mycoplasma synoviae da tampone tracheale e articolare
- Esame istologico da timo, intestino, tibia
- REAL TIME PCR per Anemia Infettiva del pollo
- Sierologia per Anemia Infettiva del pollo (ELISA)

Esito delle indagini ?

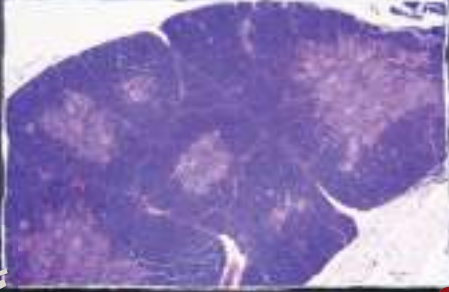

CASO CLINICO 1

- REAL TIME PCR per Mycoplasma synoviae da tampone tracheale e articolare **NEG**
- REAL TIME PCR per Anemia Infettiva del pollo **NEG**
- Sierologia per Anemia Infettiva del pollo (ELISA) **NEG**

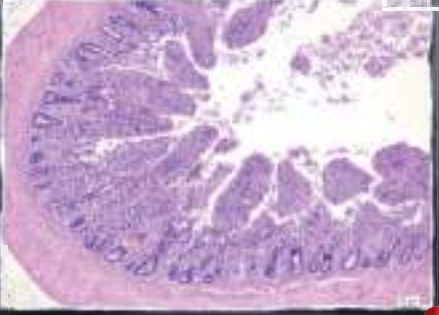




...e all'Istologia?....

CASO CLINICO 1

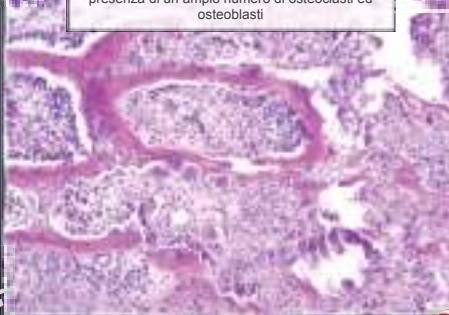




CASO CLINICO 1






presenza di un ampio numero di osteoclasti ed osteoblasti

CASO CLINICO 1

CASO CLINICO 1


RACHITISMO

- Rachitismo nutrizionale con deficit di mineralizzazione del tessuto osseo

Cause: deficit di calcio, deficit di fosforo, squilibrio calcio/fosforo, deficit vit. D, eccesso vit. A

- Sindrome da malassorbimento con diarrea, ridotto accrescimento, ipocalcemia, ipofosfatemia, deplezione vit. D

Cause: VIRUS ENTERICI



RACHITISMO

CASO CLINICO 1

Problemi enterici

Disordini nutrizionali

TRAGOPANO SATIRO
Tragopan satyra

CASO CLINICO 2

1 soggetto (1 anno)

Macroscopicamente

- buono stato di nutrizione ed idratazione
- modica quantità di liquido dalle narici
- moderata congestione dei seni infraorbitali
- iperemia laringea
- congestione tracheale con presenza di un tappo fibrinoso nel terzo distale dell'organo occludente il lume

CASO CLINICO 2

CASO CLINICO 2

CASO CLINICO 2

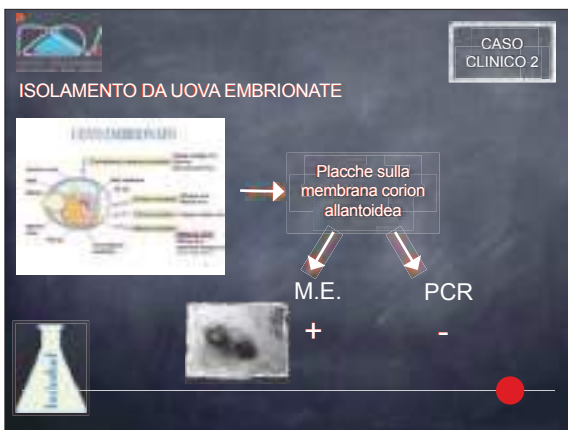
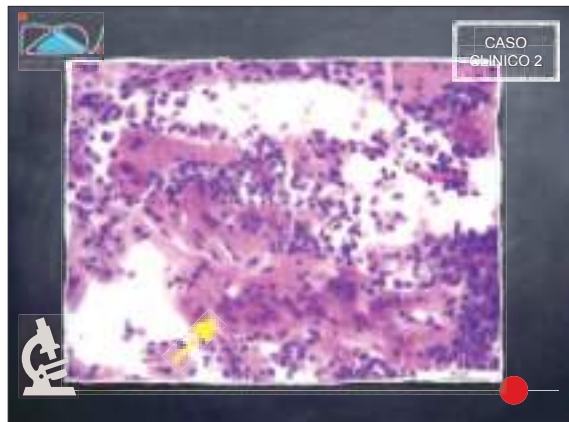
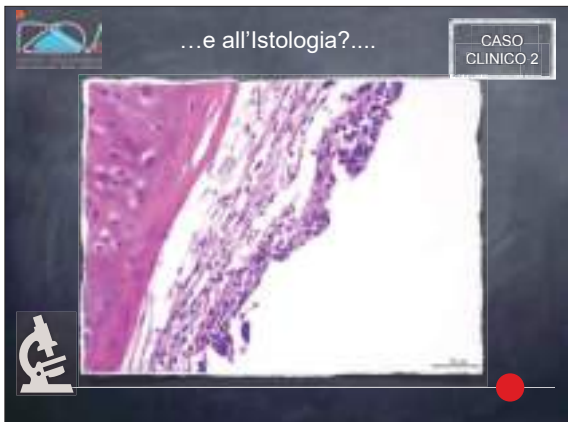
Sospetto? → Patologia virale → Coronavirus, Adenovirus, Herpesvirus

- Microscopia elettronica da raschiato tracheale (porzione prossimale)
- Esame istologico da trachea e tappo fibrinoso
- REAL TIME PCR per Laringotracheite Infettiva del pollo
- REAL TIME PCR per Bronchite Infettiva

Esito delle indagini ?

CASO CLINICO 2

- Microscopia elettronica da raschiato tracheale (porzione prossimale) **NEG**
- REAL TIME PCR per Laringotracheite Infettiva del pollo **NEG**
- REAL TIME PCR per Bronchite Infettiva **NEG**



RIEMERELLA ANATIPESTIFER E ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE: SOLO PER NON DIMENTICARE QUANDO SOSPETTARLI

Bottinelli M., Paladino A., Catania S.

Laboratorio di Medicina Aviare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Verona, Italy.

Nel settore avicolo è ben noto un gruppo di piccoli batteri Gram-negativi capaci di indurre delle malattie respiratorie che si presentano sovente con aspetti clinici molto simili. Si tratta di *Riemerella anatipestifer* e *Ornithobacterium rhinotracheale*, organismi appartenenti un tempo alla famiglia *Pasteurellaceae* e oggi riclassificati all'interno della famiglia *Flavobacteriaceae*. Tali batteri condividono caratteristiche sia genotipiche che fenotipiche, le quali giustificano la somiglianza dei segni clinici che generano negli animali [1]. In corso d'infezioni sostenute da questi batteri si registra notoriamente debolezza, scolo oculo-nasale, rantoli e starnuti; tuttavia, a volte, accanto ai classici segni clinici respiratori si possono repertare anche zoppia e lesioni osteo-articolari, risultato di una setticemizzazione dei microrganismi [1]. Sappiamo che *R. anatipestifer* presenta fattori di patogenicità ben identificati, tra cui VapD [2], CAMP emolisina [3], Proteina A [4], LPS [5] e nicotinamidasi [6]. Se da un lato conosciamo il potenziale patogeno di *R. anatipestifer*, lo stesso non accade per *O. rhinotracheale*, batterio ad oggi ancora poco studiato che possiede solo una sialidasi con forte attività neuraminidasi [7]. Tuttavia, in bibliografia *O. rhinotracheale* è descritto quale causa di malattia respiratoria e conseguente perdita economica [1]. Descriviamo qui un caso d'infezione da *O. rhinotracheale* in polli broiler di 35 giorni d'età che riportano cianosi cutanea, grave congestione tracheale, e una polmonite caratterizzata dalla presenza di essudato simile a yogurt. Gli esami di laboratorio effettuati dalle mucose respiratorie e dal polmone hanno evidenziato la presenza di Metapneumovirus aviare di tipo B, *R. anatipestifer* e *O. rhinotracheale*. La nostra ipotesi è che la presenza del virus abbia potuto facilitare la completa espressione della patogenicità dei due batteri.

Citiamo ancora un altro caso clinico, tacchini di 92 giorni d'età con anamnesi remota di metapneumovirosi aviare ormai risolta. Gli animali sono riluttanti al movimento e zoppicano notevolmente. In sede necroscopica si rileva artrosinovite fibrinosa, lesioni massa fibrino-necrotiche a livello renale e osteomielite necrotico eterofila a carico della vertebra toracica libera. L'esame batteriologico effettuato su tali matrici ha permesso di evidenziare la presenza di *O. rhinotracheale*. È interessante sottolineare che tali lesioni sono state riscontrate anche in corso di infezione generalizzata da *R. anatipestifer* in tacchini della stessa età.

In conclusione, la diagnosi definitiva delle infezioni sostenute da questi due batteri dipende dall'isolamento e dall'identificazione dell'agente patogeno, operazioni che è possibile portare a termine solo applicando accurate tecniche microbiologiche. Essere a conoscenza dell'ampio *range* di segni clinici che questi batteri possono determinare, sicuramente è d'aiuto al medico veterinario di campo che si ritrova a dover generare un sospetto diagnostico. Bisogna infine ricordare che sebbene si conosca molto riguardo i singoli agenti patogeni responsabili di malattia respiratoria, le infezioni che coinvolgono solamente un singolo microrganismo sono l'eccezione.

Pertanto è bene applicare un protocollo diagnostico volto ad escludere la presenza dei microrganismi più comuni, senza però dimenticare la possibile evenienza di patogeni “negletti”, come *R. anatipestifer* e *O. rhinotracheale*.

BIBLIOGRAFIA

1. Glisson JR. (2013). *Pasteurellosis and other respiratory bacterial infection*. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V (Eds.), *Diseases of Poultry*. 13th ed. John Wiley & Sons, pp. 807-858.
2. Chang CF, Hung PE, Chang YF. (1998). Molecular characterization of a plasmid isolated from *Riemerella anatipestifer*. *Avian. Pathol.* 27(4): 339-345.
3. Crasta KC, Chua KL, Subramaniam S, Frey J, Loh H, Tan HM. (2002). Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *J. Bacteriol.* 184(7): 1932-1939.
4. Hu Q, Han X, Zhou X, Ding C, Zhu Y, Yu S. (2011). OmpA is a virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *Vet. Microbiol.* 150(3-4):278-283.
5. Yu G, Wang X, Dou Y, Wang S, Tian M, Qi J, Li T, Ding C, Wu Y, Yu S. (2016). *Riemerella anatipestifer* M949_1360 gene functions on the lipopolysaccharide biosynthesis and bacterial virulence. *PLoS One.* 11(8):e0160708.
6. Wang X, Liu B, Dou Y, Fan H, Wang S, Li T, Ding C, Yu S. (2016). The *Riemerella anatipestifer* AS87_01735 gene encodes nicotaminidase PncA, an important virulence factor. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:5815-5823.
7. Kastelic S, Berčić RL, Cizelj I, Benčina M, Makrai L, Zorman-Rojs O, Narat M, Bisgaard M, Christensen H, Benčina D. (2013). *Ornithobacterium rhinotracheale* has neuraminidase activity causing desialylation of chicken and turkey serum and tracheal mucus glycoproteins. *Vet. Microbiol.* 162: 707-712.

SETTORE GALLINA FARAONA: ALCUNI CASI COME UTILI SPUNTI PER UNA DISCUSSIONE DIAGNOSTICA

Catania S., Bottinelli M., Marcolin R., Mantovani C., Paladino A.

Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Laboratorio Medicina Aviare, Verona

Nel presente elaborato vengono descritti alcuni casi clinici osservati nel corso dell'anno 2018 e che coinvolgono il settore della gallina faraona.

Nei primi mesi dell'anno appena trascorso, in un allevamento di gallina faraona da carne del Triveneto, venivano riportate problematiche quali incremento degli scarti ed alterazioni deambulatorie degli animali. Si registrava inoltre un aumento della mortalità nell'ultimo mese di vita, da attribuirsi verosimilmente alla selezione dei soggetti che presentavano o difformità rispetto al gruppo o deviazione laterale degli arti.

In base alle informazioni emerse in sede anamnestica (deviazione laterale degli arti), durante la necropsia è stata approfondita l'ispezione dell'apparato osteoarticolare. Più nello specifico, a livello delle articolazioni tibio tarso metatarsali, si apprezzava una intrarotazione con conseguente fuoriuscita del tendine gastrocnemio dalla sua normale sede anatomica.

Gli approfondimenti batteriologici, nonché la ricerca specifica di microorganismi come il *Mycoplasma meleagridis* ed il *Mycoplasma iowae*, hanno dato esito negativo. L'esame istopatologico segnalava al contrario un lieve assottigliamento delle trabecole ossee.

In un allevamento misto di volatili ornamentali veniva riportato un aumento della mortalità in soggetti di circa 3 mesi di vita. Di questi, è stato conferito presso il nostro laboratorio uno degli animali deceduti, esemplare di Faraona Volturina (*Acryllum vulturinum*). In sede autoptica, era possibile osservare, a carico dell'ultimo tratto del digiuno, multifocali aree circolari, di circa 0.5 cm di diametro, di natura necrotico – ulcerativa, visibili sia dalla sierosa esterna che alla sezione di taglio. Sulla base del primo sospetto diagnostico avanzato, alcune porzioni d'organo lesionate sono state analizzate per la ricerca di *Clostridium colinum* mediante PCR, il cui esito dell'esame ha dato positività.

Sempre in allevamenti di gallina faraona da carne venivano descritti casi di progressivo dimagrimento degli animali con conseguente aumento degli scarti.

Le carcasse ispezionate mostravano uno stato di nutrizione scadente ed all'apertura della cavità celomatica si osservava, in alcuni di essi, un quadro ascitico con danno epatico. Colpiva l'attenzione la notevole dilatazione del proventriglio ed il rinvenimento al suo interno di materiale alimentare digerito. Gli esami collaterali richiesti hanno permesso di escludere la presenza di un agente infettivo alla base della patogenesi delle lesioni morfologiche rinvenute. Tuttavia, risalire ad una causa precisa responsabile della dilatazione organica non è stato possibile. L'ipotesi di errori alimentari effettuati durante i primi giorni di vita, rimane tra quelle più accreditate.

I casi brevemente descritti sono un esempio di quanto sia importante per il medico veterinario assumere un approccio diagnostico vasto che spazi dal riconoscimento di malattie infettive oramai desuete negli allevamenti industriali ma che a volte ritornano in allevamenti rurali (*Clostridium colinum*); alla conoscenza dei principi nutrizionali che compongono le diete dei nostri animali e degli squilibri che ne derivano in caso di errate formulazioni (lussazione del tendine gastrocnemio) nonché tutte quelle sindromi in cui intervengono molteplici determinanti in grado di dare sinergicamente patologia (dilatazione proventricolare)

Un bagaglio di conoscenze medico scientifico approfondito e vasto è fondamentale, ma da solo non basta. L'attività diagnostica è complessa e si presenta da sempre come una sfida continua. Per meglio soddisfare le esigenze del nostro territorio, è necessaria una "valutazione multicentrica" delle sindromi, in cui competenze diverse s'interfacciano. Da una buona interconnessione, si creano reti attraverso le quali si muovono flussi informativi che partono dal quesito diagnostico posto dal territorio, passano per il suo approfondimento laboratoristico per poi dar vita a nuove vie collaterali quali la nascita di nuovi spunti di riflessione per la ricerca applicata nonché l'astrazione del dato di laboratorio a dato epidemiologico.

MASSIVA INFESTAZIONE DA *DERMANYSSUS GALLINAE* IN UN ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE

Camarda A., Circella E.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari

<p>LIII Congresso della Società italiana di Patologia Aviaria </p> <hr/> <p>Massiva infestazione da <i>Dermanyssus gallinae</i> in un allevamento di galline ovaiole</p> <p>Antonio Camarda, Elena Circella Dipartimento di Medicina Veterinaria Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"</p> <hr/> <p>Forlì, 29 marzo 2019</p>	<h3>L'azienda</h3> <ul style="list-style-type: none">• Galline ovaiole per la produzione di uova da consumo<ul style="list-style-type: none">– Batteria– 19.000 capi in un singolo capannone– 15.000 Rosse– 4.000 Bianche– 4,5 mesi di deposizione 
<p></p> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Aumento della mortalità• Calo della deposizione• Calo della pezzatura delle uova• Anemia<ul style="list-style-type: none">– Cresta pallida– Pallore delle mucose <hr/>	<h3>Lesioni anatomico-patologiche </h3> 
<h3>Lesioni Anatomico-patologiche </h3> 	<h3>Esami di Laboratorio </h3> <ul style="list-style-type: none">• Esami batteriologici negativi• Positivo per <i>Mycoplasma Synoviae</i> in PCR<ul style="list-style-type: none">– Il gruppo non era vaccinato per MS

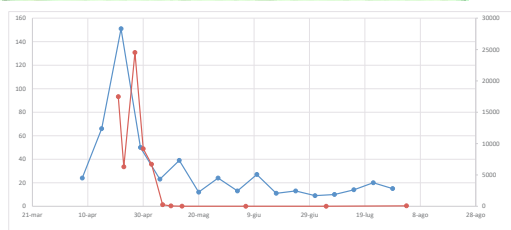
Sopralluogo



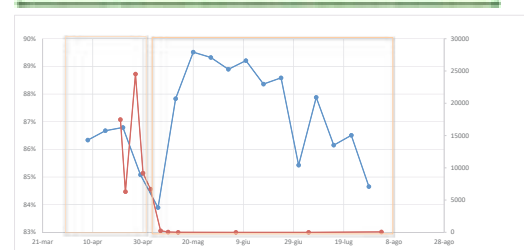
Sopralluogo



Mortalità associata ad una infestazione massiva da *Dermanyssus gallinae*



Produzione di uova e popolazione di *Dermanyssus gallinae*



Risultati del controllo della popolazione di *Dermanyssus*



- Mortalità passata da 0,72% settimanale a 0,06% settimanale
- Produzione passata da 84% a 90%
- Miglioramento della qualità delle uova
- Controllo dell'effetto patogeno esercitato da MS

Grazie per l'attenzione



L'UTILIZZO DI ACIDI ORGANICI E DERIVATI DI ERBE OFFICINALI PER CONTRASTARE L'AZIONE DI UN CEPPLO DI *ESCHERICHIA COLI* MULTI-RESISTENTE AGLI ANTIBIOTICI IN GALLINE OVAIOLE

Stamilla A.¹, Messina A.²

¹ Di3A – Università di Catania, studente di Dottorato.

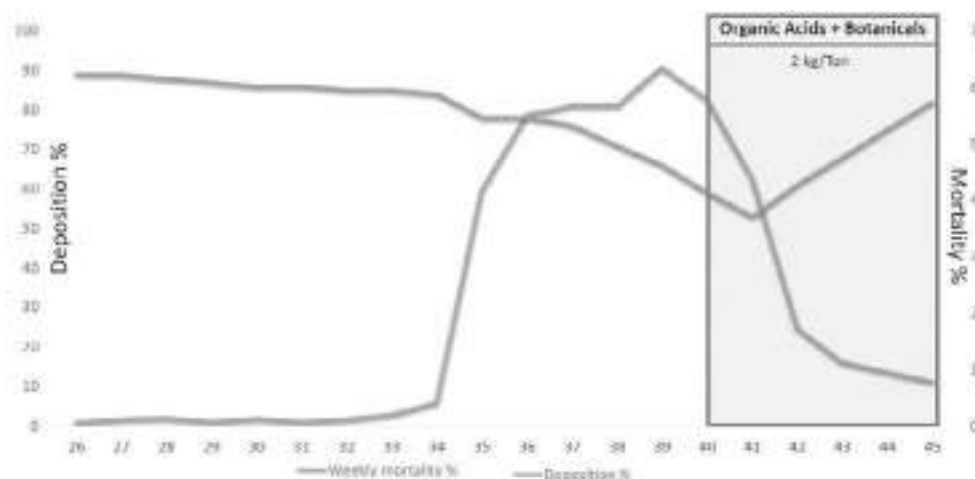
² Medico Veterinario libero professionista, consulente avicolo.

La continua selezione di ceppi batterici resistenti agli antibiotici è un tema molto studiato al giorno d'oggi, infatti, da circa un decennio le istituzioni hanno cercato di ridurre la somministrazione di antibiotici sia nel settore della patologia umana che in quella veterinaria. L'utilizzo di antibiotici in allevamento, sia come promotori della crescita che ad uso terapeutico, ha fatto sì che la selezione di ceppi multi-resistenti a svariate molecole antibiotiche sia, di anno in anno, aumentata a dismisura. In ambito veterinario, molto spesso, ci si imbatte in ceppi resistenti e spesso non si riesce a trovare una terapia adatta a risolvere il problema di infezione. Il caso proposto si riferisce all'utilizzo di una terapia non convenzionale per contrastare l'infezione di un ceppo di *Escherichia coli*, risultato resistente a più molecole antibiotiche, evitando la perdita di produzione legata ai tempi di sospensione causati dalla somministrazione di antibiotici.

N°	Antibiotic	Result
1	Aminosidine	S
2	Colistin	R
3	Enrofloxacin	R
4	Oxytetracycline	R
5	Thiamphenicol	S
6	Tilmicosin	R
7	Tylosin	R
8	Trimethoprim	R
9	Sulphametoazole	R
10	Ampicillin	R
11	Doxycycline	R
12	Flumequine	R
13	Erythromycin	R
14	Amoxicillin	R
15	Apramycin	R

L'esperienza di campo si è svolta a Malta, nell'estate del 2018 su galline ovaiole di razza Lohmann Brown, dopo lo scoppio di una epidemia di colibacillosi causata da un ceppo resistente a 13 delle 15 molecole di antibiotici di possibile utilizzo per gli avicoli. Le carcasse ritrovate nel capannone riportavano i classici sintomi della

setticemia da *E. coli*, con accumuli di fibrina nella zona addominale, pericardite fibrinosa, cuore a corazza e flogosi dell'apparato riproduttore. Dopo il prelievo di un tampone diagnostico sul fegato, la successiva coltura e identificazione presso il laboratorio dell'I.Z.S. di Ragusa, è stato isolato un ceppo di *E. coli*. L'antibiogramma sul ceppo isolato ha evidenziato le resistenze alle seguenti molecole: Colistina, Enrofloxacin, Ossitetraciclina, Tilmicosina, Tilosina, Trimethoprim, Sulfametazolo, Ampicillina, Doxaciclina, Flumequina, Eritromicina, Amoxicillina e Apramicina; mentre è risultato sensibile solo a due molecole: Amminosidina e Tiamfenicolo. La ridotta disponibilità di molecole utilizzabili e la perdita di produzione che si sarebbe potuta verificare in rispetto dei tempi di sospensione per la somministrazione di antibiotici, ha deviato la terapia su un approccio non convenzionale, basato sull'utilizzo di un blend di acidi organici e botanici sintetici, che con la loro azione sinergica riescono ad abbassare la carica batterica intestinale ristabilendo la flora batterica, contrastando l'infezione da *E. coli*.



I dati riportati nel grafico si riferiscono al ciclo produttivo in esame: alla settimana numero 36 si è avuta l'insorgenza della malattia mentre alla settimana 40 è iniziata la terapia. Come è evidente il tasso di mortalità che non aveva superato lo 0.4% prima dell'infezione da *E. coli*, era salito a 6.35%, come picco massimo, mentre la produzione era in fase calante di decine di punti percentuali. Dopo il cambio di alimentazione si è avuta una inversione di tendenza con la progressiva diminuzione della mortalità e l'aumento della produzione, fino al raggiungimento dei valori precedenti all'infezione. La somministrazione di un blend (2kg/ton) a base di acidi organici e botanici sintetici ha contrastato con successo l'infezione, che è stata debellata in sole 6 settimane, senza utilizzo alcuno di antibiotici.

ATTI DEL LVIII CONVEGNO ANNUALE

1st Joint Meeting

Organized by

*Società Italiana di Patologia Aviaria &
Associazione Scientifica di Avicoltura*

“Microbiota: Perspectives and Applications in Poultry Production Chain”


Forlì (FC), 28-29 Marzo 2019



MICROBIOME-HOST: A COMPLEX TRANSGENOMIC INTERACTION

Brigidi P.

Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna, Italy

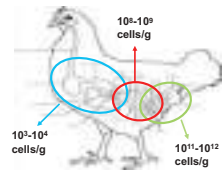


Microbiome-host: a complex transgenomic interaction

Patrizia Brigidi
Department of Pharmacy and Biotechnology
University of Bologna

INTESTINAL MICROBIOME OF POULTRY

Poultry GIT is densely populated by with microorganisms which closely and intensively interact with the host and ingested feed. PROFOUND EFFECTS ON POULTRY NUTRITION AND HEALTH OF THE HOST



Respect to mammalian:

- shorter GIT
- faster digesta transit (more sugars and peptides in the intestines of poultry than in humans)

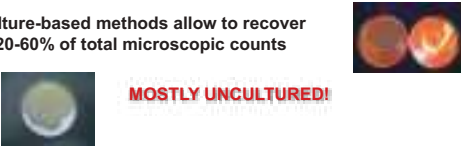
GM influenced by:

- Diet
- Age
- Environment

Yadav et al, 2019; Clavijo, 2017

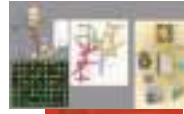
HOW DO WE KNOW THIS?

Culture-based methods allow to recover 20-60% of total microscopic counts



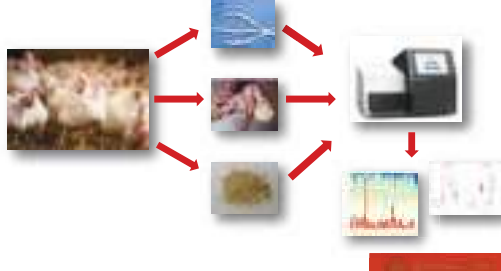
MOSTLY UNCULTURED!

Culture-independent molecular survey: NGS



DNA EXTRACTION FROM POULTRY SAMPLES

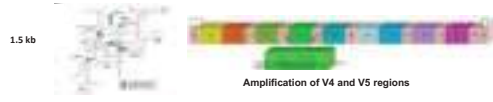
ILEUM CAECUM LITTER



NGS-BASED CHARACTERIZATION OF MICROBIOME

16S rRNA SEQUENCING: PHYLOGENETIC SURVEY

Amplification of 16S conserved regions of ALL present bacteria with a unique PCR reaction
Hypervariable regions allow to trace the species from whom they were amplified

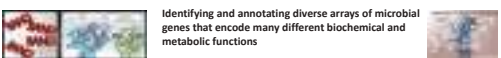



1.5 kb

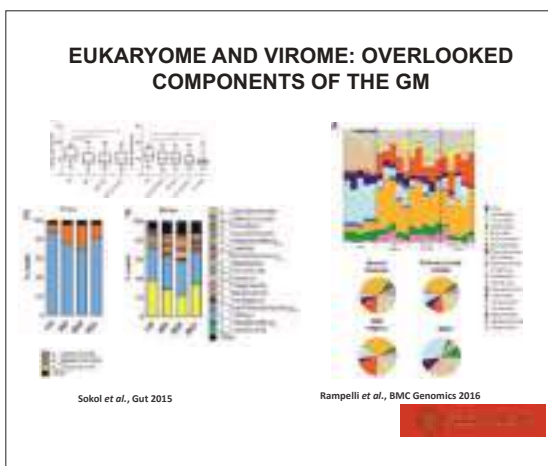
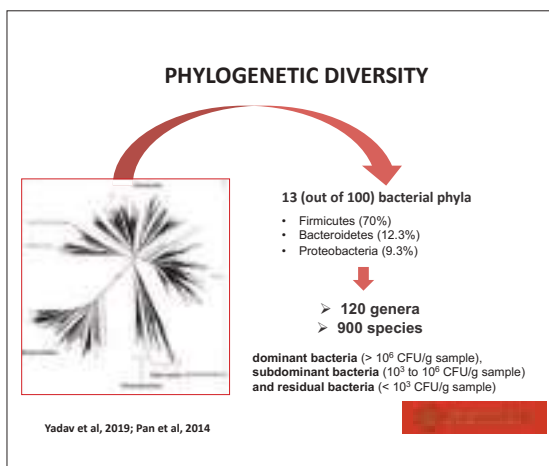
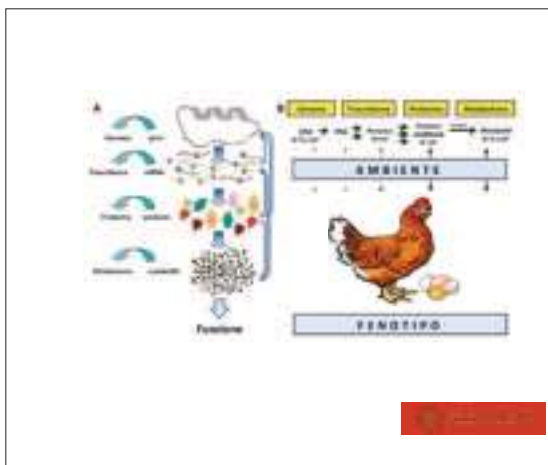
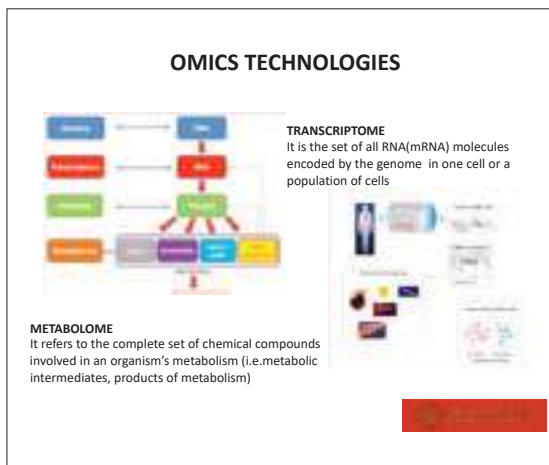
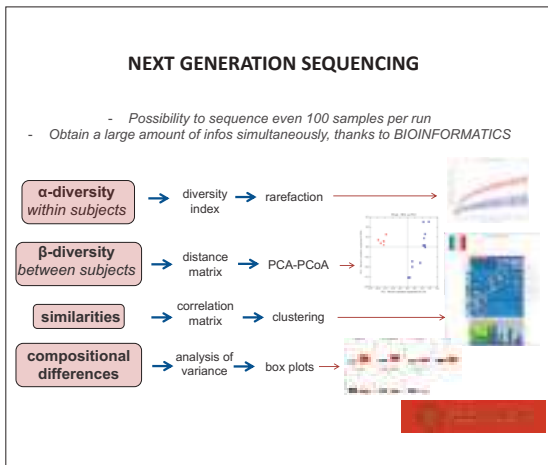
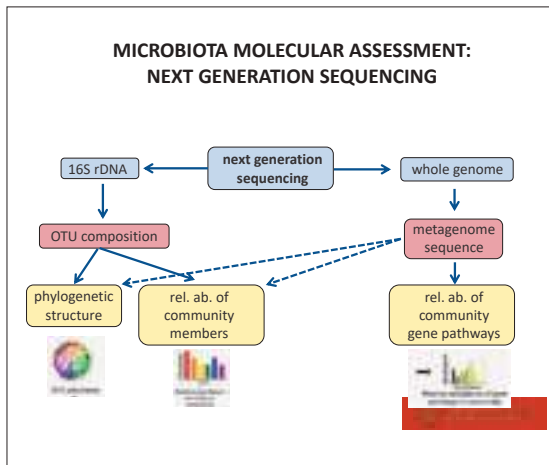
Amplification of V4 and V5 regions

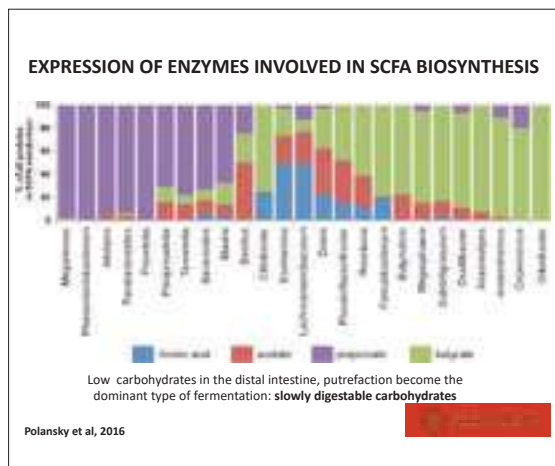
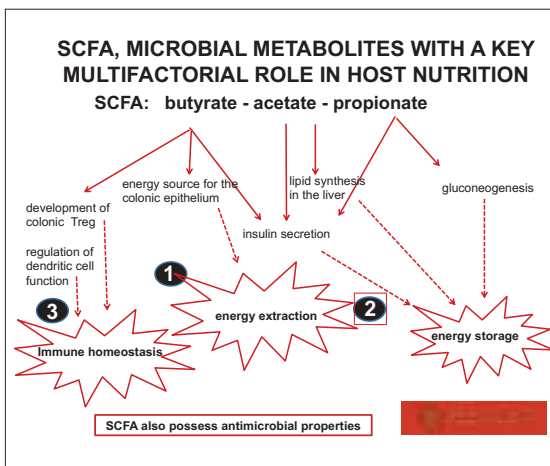
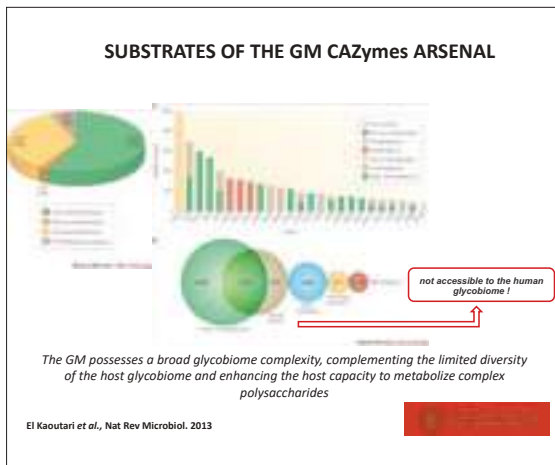
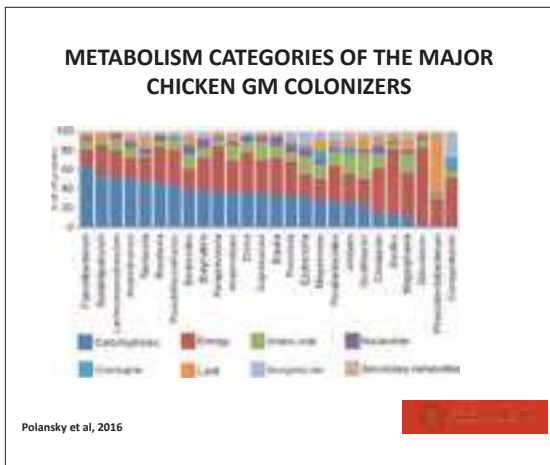
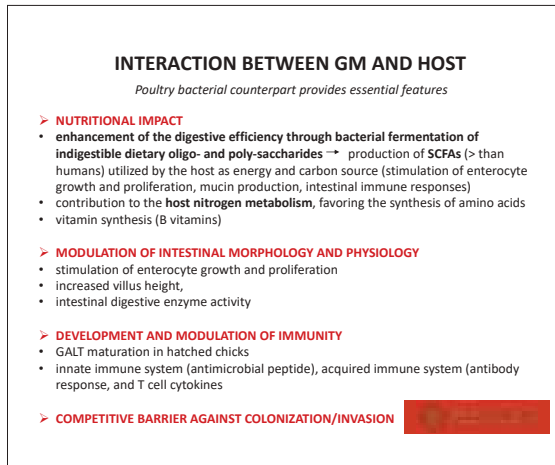
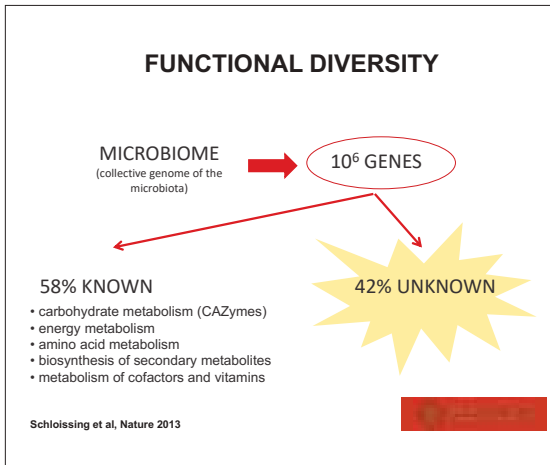
SHOTGUN SEQUENCING: FUNCTIONAL SURVEY

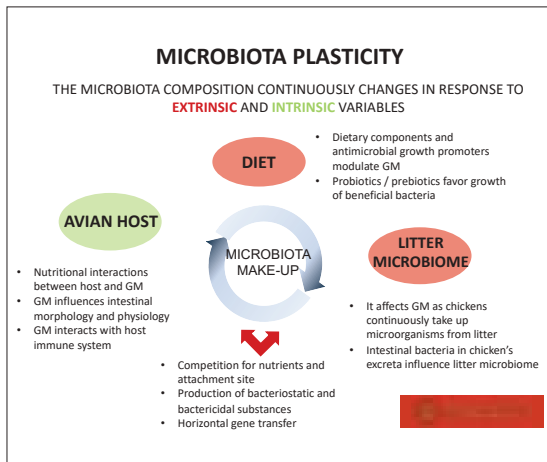
Identifying and annotating diverse arrays of microbial genes that encode many different biochemical and metabolic functions







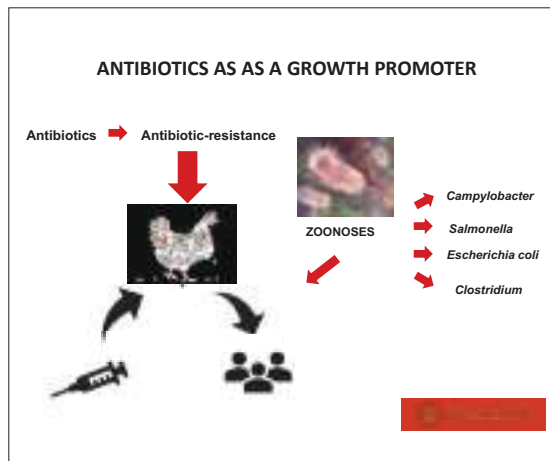
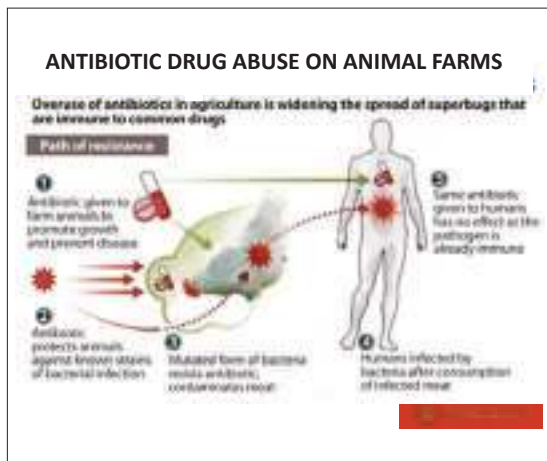




MODULATING GUT MICROBIOTA

ANTIBIOTICS promote growth performance of poultry (by *increasing the nutrient availability in the gut, decreasing amino acid catabolism and bile salts breakdown* which leads to an *increase in the digestibility of dietary protein, improving absorption of nutrients and nutrient utilization* by the gut wall due to the thinner epithelium and decreased microbial use of nutrients.

Irregular use and overuse of these antibiotics have been claimed to lead to the development of resistance by bacteria which causes a threat to the human and animal treatment as they transmit the genes for antibiotic resistance or may also exchange plasmid with inter or intra-species



MODULATING GUT MICROBIOTA (POST ANTIBIOTIC ERA)

PROBIOTICS (single or mixed cultures of living microorganisms, which, when administered in adequate amounts confers a health benefit on the host: lactic acid bacteria (LAB), fungi (*A. oryzae*) and yeast (*S. cerevisiae*)).
Multiple mechanisms: *competitive exclusion, promoting gut maturation and integrity, regulating the immune system, preventing inflammation, improving metabolism, improving growth, improve the fatty acid profile and neutralizing enterotoxin*

NEXT GENERATION PROBIOTICS, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp: no regulatory approval as a probiotics: to be demonstrated safety and efficacy strain-specific.

PREBIOTICS are non-digestible feed ingredients that are responsible for altering the composition and metabolism of gut microbiota selectively.

ORGANIC ACIDS

EXOGENOUS ENZYMES in combination with non-conventional ingredients, typically rich in fibers, used to reduce the cost of feeding and to utilize the non-conventional feed ingredients efficiently

CONCLUSIONS

Role of the microbiota on the physiological, developmental, nutritional, and immunological processes of the host and food safety

Correlations between the abundance of specific elements of the cecal microbiota and growth performance as well as improved health of poultry

Identification of phylotypes positively or negatively correlated with growth performance

Studies of the mechanisms producing these correlations

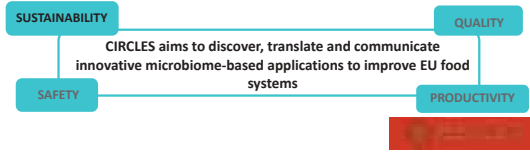
Call: H2020-SFS-03-2018



Controlling microbiomes circulations for better food systems (CIRCLES)

Coordinator Marco Candela, UniBo

- Project duration: 5 years (Start date: 1 November 2018)
- 30 partners from 15 EU countries
- EU contribution 10 million euros
- 5,000 shotgun metagenomes
- 8,000 16S rDNA NGS profiles



CIRCLES WILL PROVIDE SMART MICROBIOME FOOD SYSTEMS FOR 7 FOOD CHAINS RELEVANT TO THE EU MARKET



Spinach – Tomatoes
Romania, Italy, Spain

Poultry – Pigs
Italy

Atlantic salmon; Seabream; Fisheries
Ireland, UK, Norway; Spain, Italy, Greece



Microbiomes circulation and dynamics will be studied and optimized for better performances in terms of productivity, quality, safety and sustainability

Microbial Ecology of Health UNIT
Dept. Pharmacy and Biotechnology
University of Bologna, Italy

- Patrizia Brigidi, Full Professor
- Alina Turist, Assistant Professor
- Monica Barone, PhD student
- Federica D'Amico, PhD student
- Margherita Mianella, PhD student
- Rimona Rampelli, PhD
- Elena Rigi, PhD
- Giorgia Palladino, PhD student
- Martina Governati, PhD student
- Marco Candela, Associate Professor

THANK YOU FOR YOUR ATTENTION !!!

Controlling Microbiomes Circulations for Better Food Systems
H2020-SFS-2018-2020

Patrizia Brigidi

Department of Pharmacy and Biotechnology

patrizia.brigidi@unibo.it

www.unibo.it



REVEALING CURRENT TRENDS ON DIETARY INTERVENTIONS IN BROILER CHICKENS AND ITS GUT MICROBIOTA

Borda-Molina D., Rodehutschord M., Camarinha-Silva A.

Institute of Animal Science, University of Hohenheim, 70599 Stuttgart, Germany

Summary

The most common methodology up to date to analyze bacterial communities in the gut from broiler chickens is through high-throughput sequencing techniques. From them, targeted amplicon sequencing, followed by metagenome shotgun sequencing, as well as metaproteomics, aim to investigate a broad range of topics such as dietary effects, animal diseases, bird performance, and host genetics. In this context, it is well recognized that the diet profoundly impacts chicken microbiota. Presence or absence of specific microbes may influence a healthy gut microbial balance and enzymatic hydrolysis of specific feed fractions. Moreover, feed enzymes such as proteases and phytases are claimed to increase the overall efficiency of protein utilization in broiler chickens through increased digestibility of amino acids. Besides, phytase supplementations improve phosphorus (P) digestibility and reduce P excretion of broilers. This contribution specifically reports on studies that aimed to distinguish how enzyme supplementations may affect the microbial composition and to recognize the structural balance from the microbial ecology for both digesta and mucosal samples.

INTRODUCTION

Next-generation sequencing (NGS) techniques had allowed for a closer look into the microbiota and understand how key players can influence animal nutrition and production¹. In the National Center for Biotechnology Information (NCBI) the number of publications on broiler chicken microbiota based on NGS techniques is dominated with 16S rRNA gene catalogs. The topics are related to describing the taxonomical composition, challenges against pathogens or dietary interventions, age and sex-dependent changes in the intestinal microbiota, and responses to stress. Even though the sequencing costs are decreasing, more accurate information is still needed, like that obtained through complete genome sequencing (metagenome). In this regard, to date only eleven studies appear using this technique and only describing one of the gastrointestinal tract (GIT) sections, the caeca environment²⁻¹². With a focus on proteins, only two studies included microbial characterization of the proteome^{13,14}. Moreover, it needs to be considered that many of the studies come from pooled samples and not individual birds, thus disregarding the high effect of individual variation¹⁵. It can be concluded from this that knowledge about nutritional impact on the gut microbiome still is very rudimentary.

Based on the high impact of the microbes contributing to the digestion of feed constituents, due to its effort of converting the ingested substrates into short chain fatty acids, amines, amino acids and other compounds that affect the host^{10,16}, the recent studies focused their attention on the impact of a dietary intervention. Cereal grains are the most common energy source in diets of poultry and make up a consider-

able percentage of the diet. Depending on the cereal species and variety, the carbohydrate composition is different, which comprise a dissimilar linkage between nutrients and cell wall structure, and antinutritive compounds like non-starch polysaccharides (NSPs) ^{17,16}. Hence the addition of enzymes to reduce the viscosity of the intestinal content through reduction of antinutrients has become an accepted practice in the poultry industry.

Effects of protease supplementation

Protease addition to the feed of broiler chickens might have an impact on bird performance depending on the enzyme used ¹⁸⁻²⁰. When two levels of protease supplementation were used, the higher level of supplementation of a protease from *Bacillus licheniformis* (Ronozyme Proact – protease C), similar to a phytase (Phy), significantly increased the precaecal (pc) digestibility of not only crude protein but also of all measured amino acids (AA) compared with that of the basal diet. On average, the percentage of pc AA digestibility was 82% (basal diet), 84% (high dosage of protease C), and 85% (Phy) ¹⁸. Other treatments (two other protease products in two levels each) did not cause a consistent effect on pc AA digestibility. After considering the differences in digestibility, it was concluded that this trait responds product-specific and dose-dependent. Increase in pc AA digestibility due to protease supplementation has been attributed in part to a reduction of basal endogenous AA loss ²¹. A dose-dependent effect of Proteases was also determined by Angel et al. (2011) ²², who found that protease supplementation to be fully expressed at the 200 mg/kg supplementation level. This confirms that protease product and supplementation level can partly explain different effects on pc CP and AA digestibility. Correlation of the performance data and the microbial composition was not obtained; however, stimulation in the main bacterial groups analyzed was observed.

Protease supplements altered the overall microbial composition. A total of 1,021 OTU were identified from the entire dataset ¹⁸. Firmicutes were the most abundant phylum, commonly observed across all diet treatments (>98%). A significant difference between the bacterial profiles at the genus level was observed. Large genera diversity was achieved in the protease A supplemented diet; meanwhile, the higher diversity index (Shannon-Weaver) was registered for Phy and the low supplementation level of Protease B ¹⁸.

Permanova values at genus level showed a significant difference in the pairwise comparison within protease B, C, and Phy. These alterations were driven by the high dominance of *Lactobacillus* in protease C at the low level while this dominance decreased in the treatments with protease B and Phy, where a higher presence of a group assigned to an uncultured Clostridiaceae 1 was detected. Also, *Enterococcus*, a genus usually found in low abundance in the small intestine of broiler chickens ²³, resulted in increased values for the protease C treatment. An uncultured *Clostridium* XI was seen to be promoted by the addition of phytase. *Streptococcus* counts increased with both dosages of protease B (24% and 30% for the low and high supplementation levels) when compared with 13% abundance in diets containing protease C. An OTU related to *Streptococcus alactolyticus* contributed to 20% of the total community in the

low supplementation levels of protease B and C. The genus *Clostridium* XI was more abundant when Phy or the higher level of protease C was supplemented ¹⁸.

Modified microbiota composition probably can be attributed to the different modes of action of the enzymes. Protease A is obtained from the fungi *A. niger*, whereas proteases B and C are derived from *B. licheniformis*. Enzymes synthesized from different microorganisms catalyze precise reactions that are influenced by the case-specific evolution of the protein ²⁴. An influence on pc AA digestibility probably is specific for individual sources of proteases. A study testing two proteases in degrading whey protein found that a more significant extent of protein hydrolysis occurred at higher concentrations of the enzymes ²⁵.

Furthermore, a single type of protease action resulted in a hydrolysate richer in peptides, whereas in others, it was more abundant in AA ²⁵. Another potential influencing factor on enzyme activity is the substrate concentration. A protease isolated from *B. licheniformis* had a reduced rate of hydrolysis and enzyme selectivity with increased substrate concentration ²⁶. On the contrary, protease from *A. niger* revealed that at least 30% of the activity could be increased if optimal conditions are provided ²⁷. These facts can lead to the different availability of products that do not affect the measurements of digestibility but may impact the microbial composition.

Effects of addition phytase, calcium, and phosphorus

The addition of phytase to diets for poultry is a well-recognized tool to increase the availability of phosphorus (P) present in plant-based diets. The presence of phytase can lead to chemical changes in the GIT, which also affect the availability of other minerals such as calcium (Ca) ²⁸. In a study using samples from individual chicken ¹⁵, communities associated to the mucosal layer of the intestinal epithelium seemed to be more stable than communities from the content, at least in the number of phylotypes obtained. Lower diversity was obtained in the dietary treatment with Ca supplementation, and this coincided with lower performance of the birds.

In this study with different combinations of Ca, P, and phytase the average similarity within replicates of digesta and mucosa samples across all diets ranged from 29 to 82% in the crop, 19–49% in the ileum, and 17–39% in caeca, these highlighting the importance of using individual samples in microbiota studies. A total amount of 1796 OTUs were detected in the 281 samples, being the caeca the most diverse environment (1302 OTUs), followed by ileum (1189 OTUs) and crop (690 OTUs). In these three environments, the mucosa samples contained more OTUs when compared to the digesta, indicating less fluctuation in the microbes due to a better establishment of the communities when they are in close interaction with the host ¹⁵.

The majority of the microorganisms colonizing the three aforementioned GIT sections belonged to the phylum Firmicutes, as commonly described in previous studies ^{18,29,30}. Each treatment affected microbial communities within individual sections; however, no diet showed a consistent effect across all GIT sections, which can primarily be attributed to the considerable variability among replicates ¹⁵. Independent of the core

microbiota colonization, there is a significant variation in the relative abundance of specific bacterial groups between individuals. A possible explanation is that shifts in the microbial composition are influenced by the initially colonizing microbiota, diet, and immune system of the host ²⁹.

In the crop *Lactobacillus* was the most dominant genus, with two OTUs registering the higher abundances; specifically, *Lactobacillus taiwanensis* and *L. gallinarum*. An effect of the presence of calcium was reported for the crop after relating it to lower growth and feed consumption, together with a decrease in microbial diversity ¹⁵.

Meanwhile, in the ileum *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and some uncultured microbes belonging to the families Peptostreptococcaceae, Lachnospiraceae, Burkholderiaceae, and *Clostridium* XI were observed ¹⁵. In the ileum mucosa, an effect of P supplementation was observed, where higher similarities in the microbial distributions were obtained for either supplemented or not diets. The digesta samples belonging to diets supplemented with Ca were significantly different from samples derived from low-Ca diets. It is known that higher doses of Ca in the diets can lead to an increase of the pH ³⁰ and low precaecal P digestibility ^{31,32}, which could influence the presence or absence of some OTUs. In the mucosa, P supplementation increased the abundance of *Streptococcus*. Lu et al. (2003) demonstrated that sequences of OTUs related to this genus were more prevalent in the ileum digesta than in the caeca ²³. Following the study of Ptak et al. (2015), *Streptococcus* abundance was reduced in diets supplemented with Ca, P, and phytase ³⁰.

A high proportion of microorganisms belonging to order Clostridiales were detected in the caeca. This group is known to be an indicator of healthy chickens due to its central role in SCFA metabolism ³³. Additionally, OTUs belonging to Lachnospiraceae are known to degrade complex polysaccharides to SCFA ³⁴. They were more abundant in digesta samples of diets supplemented with P (12–22%), while in the mucosa showed a similar distribution within all diets (17–28%). In the caeca digesta, with 81% of similarity, groups supplemented or not with P were present, and for instance, the supplementations influenced the higher presence of uncultured Lachnospiraceae, while no addition seems to favor uncultured Ruminococcaceae. On the other hand, the mucosa samples with no addition of Ca clustered groups with 85% of similarity ¹⁵.

Caeca digesta and mucosa samples showed a more diverse community at genus level compared to other sections ¹⁵. This fact was previously reported in chickens under standard commercial conditions ^{35,10,36} and in chickens exposed to different supplementation of monocalcium phosphate and phytase ³⁷. Several studies have shown that higher diversity in the caeca is due to the low passage rate, pH, and the presence of small and soluble particles, which enhance the role of the microorganisms in assimilation of nutrients from food, in producing vitamins, and amino acids ^{38,10}, and protecting the host against pathogens ³⁵.

CONCLUSION

We conclude that enzyme supplementation effects were evident in the terminal small intestine microbiota composition, and to a lesser extent, in pc AA digestibility. How-

ever, the changes in microbiota composition and pc AA digestibility could not be correlated, indicating the absence of a causal relationship. Mucosa and digesta type of samples differed in the microbial community resemblance indicating a need to investigate both environments. It was also demonstrated that mineral supplementations modify the composition and functionality of the metagenomes.

REFERENCES

1. Borda-Molina D, Seifert J, Camarinha-Silva A (2018). Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 16:131-139. doi:10.1016/j.csbj.2018.03.002.
2. Huang P, Zhang Y, Xiao K, et al (2018). The chicken gut metagenome and the modulatory effects of plant-derived benzyloisoquinoline alkaloids. *Microbiome*. 6(1):211. doi:10.1186/s40168-018-0590-5.
3. Thomas M, Wongkuna S, Ghimire S, et al. (2019). Gut Microbial Dynamics during Conventionalization of Germfree Chicken. *mSphere*. 4(2). doi:10.1128/mSphere.00035-19.
4. Zhu L, Liao R, Wu N, Zhu G, Yang C. (2019). Heat stress mediates changes in fecal microbiome and functional pathways of laying hens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 103(1):461-472. doi:10.1007/s00253-018-9465-8.
5. Pineda-Quiroga C, Borda-Molina D, Chaves-Moreno D, et al (2019). Microbial and Functional Profile of the Ceca from Laying Hens Affected by Feeding Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics. *Microorganisms*. 7(5). doi:10.3390/microorganisms7050123.
6. Ding J, Zhao L, Wang L, et al. (2016). Divergent selection-induced obesity alters the composition and functional pathways of chicken gut microbiota. *Genet Sel Evol*. 48. doi:10.1186/s12711-016-0270-5.
7. Hou Q, Kwok L-Y, Zheng Y, et al. (2016). Differential fecal microbiota are retained in broiler chicken lines divergently selected for fatness traits. *Sci Rep*. 6:37376. doi:10.1038/srep37376.
8. Ma L, Xia Y, Li B, et al. (2016). Metagenomic Assembly Reveals Hosts of Antibiotic Resistance Genes and the Shared Resistome in Pig, Chicken, and Human Feces. *Environ Sci Technol*. 50(1):420-427. doi:10.1021/acs.est.5b03522.
9. Qu A, Brulc JM, Wilson MK, et al. (2008). Comparative metagenomics reveals host specific metavirolomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS ONE*. 3(8):e2945. doi:10.1371/journal.pone.0002945.
10. Sergeant MJ, Constantinidou C, Cogan TA, Bedford MR, Penn CW, Pallen MJ. (2014). Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS ONE*. 9(3):e91941. doi:10.1371/journal.pone.0091941.
11. Singh KM, Shah TM, Reddy B, Deshpande S, Rank DN, Joshi CG. (2014). Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. *J Appl Genet*. 55(1):145-154. doi:10.1007/s13353-013-0179-4.
12. Danzeisen JL, Kim HB, Isaacson RE, Tu ZJ, Johnson TJ. (2011). Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS ONE*. 6(11):e27949. doi:10.1371/journal.pone.0027949.

13. Tilocca B, Witzig M, Rodehutschord M, Seifert J. (2016). Variations of Phosphorous Accessibility Causing Changes in Microbiome Functions in the Gastrointestinal Tract of Chickens. *PLoS ONE*. 11(10):e0164735. doi:10.1371/journal.pone.0164735.
14. Tang Y, Underwood A, Gielbert A, Woodward MJ, Petrovska L. (2014). Metaproteomics analysis reveals the adaptation process for the chicken gut microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 80(2):478-485. doi:10.1128/AEM.02472-13.
15. Borda-Molina D, Vital M, Sommerfeld V, Rodehutschord M, Camarinha-Silva A. (2016). Insights into Broilers' Gut Microbiota Fed with Phosphorus, Calcium, and Phytase Supplemented Diets. *Front Microbiol*. 7:2033. doi:10.3389/fmicb.2016.02033.
16. Pan D, Yu Z. (2013). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 5(1):108-119. doi:10.4161/gmic.26945.
17. Choct M, Hughes RJ, Wang J, Bedford MR, Morgan AJ, Annison G. (1996). Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *Br Poult Sci*. 37(3):609-621. doi:10.1080/00071669608417891.
18. Borda-Molina D, Zuber T, Siegert W, Camarinha-Silva A, Feuerstein D, Rodehutschord M. (2019). Effects of protease and phytase supplements on small intestinal microbiota and amino acid digestibility in broiler chickens. *Poult Sci*. doi:10.3382/ps/pez038.
19. Cowieson AJ, Ravindran V. (2007). Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *Br J Nutr*. 98(4):745-752. doi:10.1017/S0007114507750894.
20. Sommerfeld V, Schollenberger M, Kühn I, Rodehutschord M. (2018). Interactive effects of phosphorus, calcium, and phytase supplements on products of phytate degradation in the digestive tract of broiler chickens. *Poult Sci*. 97(4):1177-1188. doi:10.3382/ps/pex404.
21. Cowieson AJ, Roos FF. (2016). Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 221:331-340. doi:10.1016/j.anifeeds-ci.2016.04.015.
22. Angel CR, Saylor W, Vieira SL, Ward N. (2011). Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. *Poult Sci*. 90(10):2281-2286. doi:10.3382/ps.2011-01482.
23. Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol*. 69(11):6816-6824. doi:10.1128/aem.69.11.6816-6824.2003.
24. López-Otín C, Bond JS. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*. 283(45):30433-30437. doi:10.1074/jbc.R800035200.
25. Pintado ME, Pintado AE, Malcata FX. (1999). Controlled whey protein hydrolysis using two alternative proteases. *Journal of Food Engineering*. 42(1):1-13. doi:10.1016/S0260-8774(99)00094-1.
26. Butré CI, Sforza S, Gruppen H, Wierenga PA. (2014). Determination of the influence of substrate concentration on enzyme selectivity using whey protein Isolate

- and *Bacillus licheniformis* protease. *J Agric Food Chem.* 62(42):10230-10239. doi:10.1021/jf503151f.
27. Mandal C, Gudi RD, Suraishkumar GK. (2005). Multi-objective optimization in *Aspergillus niger* fermentation for selective product enhancement. *Bioprocess Biosyst Eng.* 28(3):149-164. doi:10.1007/s00449-005-0021-4.
 28. Rodehutsord M, Rosenfelder P. (2016). Chapter 1 Update on phytate degradation pattern in the gastrointestinal tract of pigs and broiler chickens. In: Walk CL, Kühn I, Stein H, Kidd MT, Rodehutsord M, eds. *Phytate destruction: Consequences for precision animal nutrition / edited by: C.L. Walk, I. Kühn, H.H. Stein, M.T. Kidd and M. Rodehutsord.* Vol. 6. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 15-32.
 29. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 14(1):20-32. doi:10.1038/nrmicro3552.
 30. Ptak A, Bedford MR, Świątkiewicz S, Żyła K, Józefiak D. (2015). Phytase Modulates Ileal Microbiota and Enhances Growth Performance of the Broiler Chickens. *PLoS ONE.* 10(3). doi:10.1371/journal.pone.0119770.
 31. Adeola O, Walk CL. (2013). Linking ileal digestible phosphorus and bone mineralization in broiler chickens fed diets supplemented with phytase and highly soluble calcium. *Poult Sci.* 92(8):2109-2117. doi:10.3382/ps.2013-03068.
 32. Hamdi M, López-Vergé S, Manzanilla EG, Barroeta AC, Pérez JF. (2015). Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. *Poult Sci.* 94(9):2144-2151. doi:10.3382/ps/pev177.
 33. Choi KY, Lee TK, Sul WJ. Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens — A Review. (2015). *Asian-Australas J Anim Sci.* 28(9):1217-1225. doi:10.5713/ajas.15.0026.
 34. Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. (2013). Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity.* 5(3):627-640. doi:10.3390/d5030627.
 35. Stanley D, Geier MS, Hughes RJ, Denman SE, Moore RJ. (2013). Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PLoS ONE.* 8(12):e84290. doi:10.1371/journal.pone.0084290.
 36. Mohd Shaufi MA, Sieo CC, Chong CW, Gan HM, Ho YW. (2015). Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog.* 7:4. doi:10.1186/s13099-015-0051-7.
 37. Witzig M, Camarinha-Silva A, Green-Engert R, et al. (2015). Correction: Spatial Variation of the Gut Microbiota in Broiler Chickens as Affected by Dietary Available Phosphorus and Assessed by T-RFLP Analysis and 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE.* 10(12):e0145588. doi:10.1371/journal.pone.0145588.
 38. Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. (2002). 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(1):124-137. doi:10.1128/AEM.68.1.124-137.2002.



SEQUENCING STRATEGIES TO INVESTIGATE THE DYNAMICS OF MICROBIAL COMMUNITIES IN POULTRY: STATE OF ART AND FUTURE OPPORTUNITIES

Manfreda G., De Cesare A.

Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Italy



Sequencing strategies to investigate the dynamics of microbial communities in poultry: state of art and future opportunities

Gerardo Manfreda e Alessandra De Cesare

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari
Centro Interdipartimentale per la Ricerca Industriale Agroalimentare

Context

Significant differences have been described in the taxonomic composition of the different organs and even sections within the GIT, which means that they could be considered separate ecosystems, and microorganisms perform independent functions in each of the organ

- Lactobacillus spp predominate in the crop, which are responsible for the fermentation of starch and lactate production;
- Clostridiaceae family and Lactobacillaceae predominate in the gizzard with less fermentation activity;
- The small intestinal microbiota is dominated by Lactobacillus spp, Enterococcus spp, and various Clostridiaceae
- Ileum was reported as a source of novel bacteria, especially butyrate producers.
- the microbiota of the ceca (mainly Clostridium, Ruminococcus, Eubacterium, Faecalibacterium, and Lactobacillus species among a number of unknown and uncultured phylotypes) is associated with the digestion of foodstuffs rich in cellulose, starch, and polysaccharides, which are resistant to bacterial digestion in the small intestine

Stanley et al.,2014; Han et al., 2016

Chicken microbiome results: prediction of the most active metabolic pathways



Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome

Target genes for detecting GIT microbiota's role metagenome in chicken metabolism



Gene	Function	Key pathway
Glucanase	Glucanase	Starch and glycogen metabolism
Cellulase	Cellulase	Starch and glycogen metabolism
Protease	Protease	Protein metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism
Amylase	Amylase	Starch and glycogen metabolism
Cellulose 1,4-beta-D-glucosylase	Cellulose 1,4-beta-D-glucosylase	Starch and glycogen metabolism
Cellulose 1,4-galactosylase	Cellulose 1,4-galactosylase	Starch and glycogen metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism
Phosphatase	Phosphatase	Phosphate metabolism

Summary

- Metagenomic sequencing
 - ✓ Key parameters to follow in metagenomic sequencing
- Applications of metagenomics in poultry science to investigate:
 - ✓ Dynamic of gut microbiome by using a probiotic strains
 - ✓ Dynamic of gut microbiome by modifying the diet composition
 - Study of safety and microbiota composition of poultry carcasses by metagenomic approach
- Conclusions and future opportunities

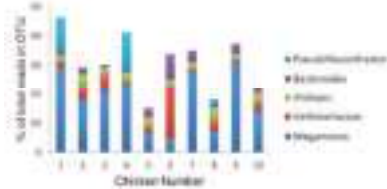
Schematic workflow of the approaches that may be followed when implementing WGS or WMS methodologies for microbiome analysis



Oniciuc et al., Genes 2018, 9, 268

How many samples should I include in a metagenomic investigation ?

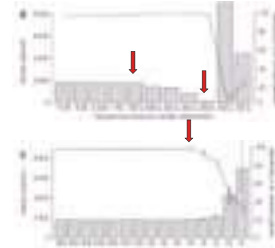
- 414,070 16S sequences classified in 699 phylotypes (similarity threshold 97%)
- 200-350 phylotypes/chicken
- 232 phylotypes (33.2%) represented new species



Sergeant et al., 2014

How many samples should I include in a metagenomic investigation ?

- 19 over 396 individuals sampled consumed a fermented milk product containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CNCM I-2494 (BA).
- 95% of the BA reference genes were captured in MGS 337 even though 0.3% of the reads in the 19 samples originated from BA.



The number of samples to test is more critical than sequencing depth: which number for poultry study ?

Nielsen et al., 2014

How deep should a sequence in a metagenomic investigation ?



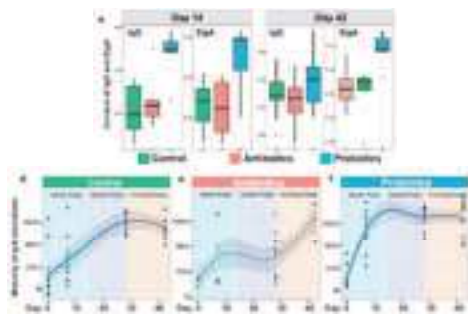
- The genome of a single species can be accurately assembled from a complex metagenomic dataset when it shows at least 20X coverage.
- At least 7 Gb (10^9 bases) of sequencing output/sample is required to enumerate the gene contents of prokaryotes with relative abundance of more than 1% in a microbiome.

7 Gb/sample can be taken as sequencing depth reference value for metagenomics

Summary

- Metagenomic sequencing
 - Key parameters to follow in metagenomic sequencing
- Applications of metagenomics in poultry science to investigate:
 - Diversity of gut microbiome by using a probiotic strain
 - Diversity of gut microbiome by modifying the diet composition
 - Effect of safety and nutritional composition of quality standards by metagenomic approach
- Conclusions and future opportunities

Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken



Gao et al. Microbiome (2017) 5:91

LACTOBACILLUS TRIAL (LA)

L. acidophilus D2/CSL
(bacterial concentration of 5.0×10^{10} cfu/g⁻¹)



- 360 Females Ross 308
- Control (CON) (40*3 birds)
 - Low dose (LD) (40*3 birds)
 - High dose (HD) (40*3 birds)

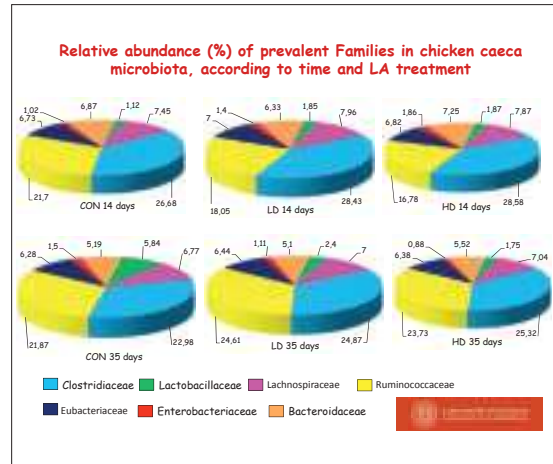
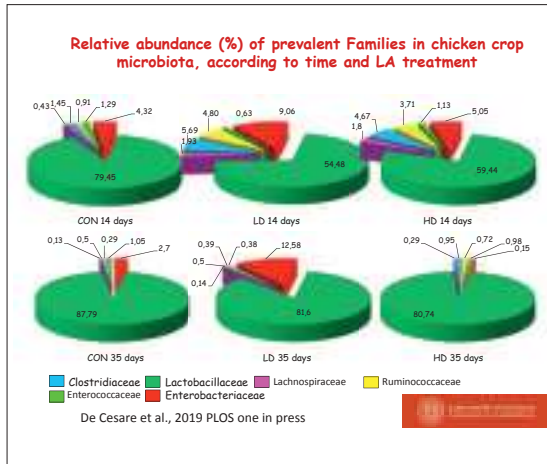
Dosage:
0.02g/day/bird for LD in water
0.2g/day/bird for HD in water



Sampling Time 1d, 14d and 42d

- 5 caeca collected day 1
- 9 caeca collected day 14/each group (27 birds)
- 9 caeca collected day 35/each group (27 birds)

De Cesare et al., 2019 PLOS one in press



Relative abundance (%) of the top five Species in chicken crop microbiota, according to time and LA treatment

CON 14d	LD 14d	HD 14d	CON 35d	LD 35d	HD 35d
Lactobacillus johnsonii (36.29)	Lactobacillus johnsonii (28.99)	Lactobacillus johnsonii (21.42)	Lactobacillus crispatus (21.43)	Lactobacillus johnsonii (30.58)	Lactobacillus johnsonii (29.67)
Lactobacillus salivarius (20.25)	Lactobacillus salivarius (6.86)	Lactobacillus acidophilus (14.09)	Lactobacillus johnsonii (19.77)	Lactobacillus crispatus (15.57)	Lactobacillus crispatus (18.93)
Lactobacillus gasseri (7.83)	Lactobacillus gasseri (7.09)	Lactobacillus salivarius (11.27)	Lactobacillus acidophilus (11.80)	Lactobacillus reuteri (8.92)	Lactobacillus acidophilus (9.33)
Lactobacillus crispatus (2.15)	Providencia alcalifaciens (3.19)	Lactobacillus gasseri (5.16)	Lactobacillus helveticus (6.14)	Escherichia coli (8.86)	Lactobacillus gasseri (5.96)
Escherichia coli (1.98)	Escherichia coli (3.13)	Providencia alcalifaciens (3.55)	Lactobacillus reuteri (5.86)	Lactobacillus acidophilus (7.70)	Lactobacillus reuteri (4.35)

De Cesare et al., 2019 PLOS one in press

Relative abundance (%) of the top five Species in chicken caecum microbiota, according to time and LA treatment

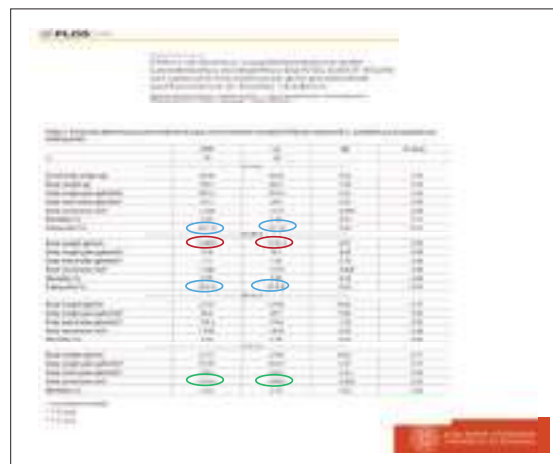
CON 14d	LD 14d	HD 14d	CON 35d	LD 35d	HD 35d
Bacteroides capillosus (6.06)	Bacteroides capillosus (5.49)	Bacteroides capillosus (6.44)	Faecalibacterium prausnitzii (5.26)	Faecalibacterium prausnitzii (8.54)	Faecalibacterium prausnitzii (9.20)
Subdoligranum variabile (4.79)	Clostridium saccharolyticum (3.80)	Clostridium saccharolyticum (4.02)	Bacteroides capillosus (4.44)	Bacteroides capillosus (4.26)	Bacteroides capillosus (4.69)
Ruminococcaceae bacterium D16 (3.34)	Eubacterium rectale (2.87)	Eubacterium rectale (2.92)	Subdoligranum variabile (2.30)	Subdoligranum variabile (3.70)	Clostridium saccharolyticum (3.17)
Clostridium saccharolyticum (3.26)	Ruminococcaceae bacterium D16 (2.41)	Clostridium sp. M62/1 (2.87)	Clostridium saccharolyticum (2.46)	Clostridium saccharolyticum (2.98)	Subdoligranum variabile (2.77)
Eubacterium rectale (2.76)	[Ruminococcus] torques (2.32)	Blautia hansenii (2.71)	Eubacterium rectale (2.43)	Eubacterium rectale (2.57)	Eubacterium rectale (2.57)

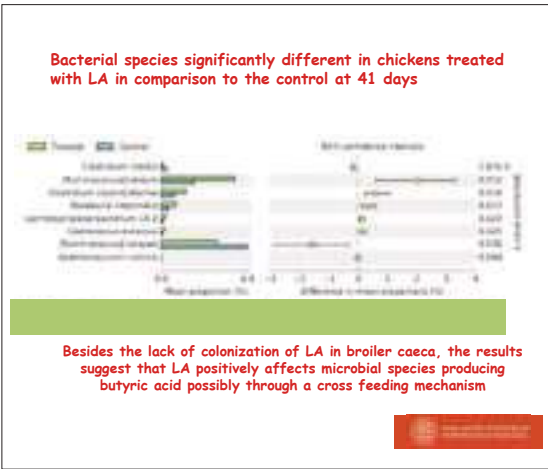
De Cesare et al., 2019 PLOS one in press

Functional genes with a mean relative frequency of abundance (S.E.) > 1 in caeca and crops in at least one group, meaning high dose (HD) 14 and 35 days (d), low dose (LD) 14 and 35 days, control (C) 14 and 35 days.

	HD 14 d	HD 35 d	LD 14 d	LD 35 d	C 14 d	C 35 d
% of mean relative frequency of abundance in caeca						
Cytochrome c oxidase polypeptide II (EC 1.9.3.1)	0.002 (0.001)	0.001 (0.001)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	0.000 (0.000)	0.002 (0.001)
Cytochrome c oxidase polypeptide III (EC 1.9.3.1)	0.004 (0.002)	0.004 (0.002)	0.002 (0.001)	0.002 (0.001)	0.001 (0.000)	0.002 (0.001)
GTP-binding protein	0.266 (0.004)	0.293 (0.007)	0.277 (0.011)	0.291 (0.009)	0.286 (0.009)	0.308 (0.007)
NADH dehydrogenase subunit I	0.003 (0.002)	0.002 (0.001)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	0.000 (0.000)
Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase (EC 1.2.2.-)	0.415 (0.015)	0.224 (0.011)	0.441 (0.028)	0.228 (0.014)	0.564 (0.046)	0.446 (0.027)
% of mean relative frequency of abundance in crop						
Cytochrome c oxidase polypeptide III (EC 1.9.3.1)	0.852 (0.157)	0.088 (0.073)	0.669 (0.096)	0.005 (0.002)	0.736 (0.049)	0.002 (0.001)
GTP-binding protein	0.859 (0.117)	0.332 (0.022)	1.018 (0.320)	0.356 (0.031)	0.713 (0.023)	0.318 (0.006)
NADH dehydrogenase subunit I	0.825 (0.178)	0.076 (0.067)	0.874 (0.076)	0.002 (0.001)	0.729 (0.067)	0.001 (0.000)

De Cesare et al., 2019 PLOS one in press





Poultry Science 2019 in press

Experimental design

	Group A		Group B		Group C	
Cycle 1	Fresh litter + A1		Fresh litter + S (B1)		Fresh litter + PB (C1)	
Cycle 2	Fresh litter (A2)		Reused litter + PB (B2)		Reused litter + PB (C2)	
Cycle 3	Reused litter (A3)		Reused litter + PB (B3)		Reused litter + PB (C3)	

Family	Group A2		Group A3		Group B2		Group B3		Group C2		Group C3	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Ruminococcaceae	21.696	3.513	28.461	4.576	29.674	4.906	25.977	5.174	25.571	4.410	23.355	3.088
Chloridaceae	17.771	2.972	18.561	2.313	19.206	2.360	20.178	3.135	18.899	1.455	21.551	2.994
Lachnospiraceae	14.142	2.550	9.748	1.145	11.172	1.614	10.715	2.946	12.172	2.586	12.343	2.063
Lactobacillaceae	13.105	4.960	7.583	2.692	6.648	2.220	8.622	2.641	5.498	2.617	5.089	2.206
Eubacteriaceae	6.311	3.531	4.813	2.384	4.399	1.280	3.234	0.788	5.531	1.066	4.157	2.116
Erysipelotrichaceae	2.363	0.642	1.909	0.952	2.174	0.967	2.350	1.195	2.352	0.614	2.497	1.089
Peptococcaceae	0.249	0.284	1.767	0.740	2.232	0.573	2.040	1.217	2.274	0.591	1.996	0.374
Bacillaceae	2.226	0.719	2.545	1.406	2.747	0.995	1.714	0.761	2.523	0.749	2.671	1.942
Bacteroidaceae	2.115	1.643	9.219	3.801	1.700	0.703	9.440	2.610	2.996	1.628	0.315	0.127

Comparative analysis of bacterial genus associated to caecum of broiler by using Bacillus spores in the litter

Genus	Group A2		Group A3		Group B2		Group B3		Group C2		Group C3	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Lactobacillus	11.019	4.962	7.467	2.638	6.599	2.214	8.595	2.639	3.444	2.582	4.994	2.136
Clostridium	11.518	2.169	11.440	1.636	11.936	1.182	12.588	2.093	11.280	1.387	14.067	2.100
Faecalibacterium	9.214	2.386	17.328	3.346	14.309	3.233	13.063	4.013	13.045	4.226	10.804	2.151
Eubacterium	6.285	1.941	4.451	2.447	4.579	1.279	5.236	0.747	3.499	1.078	4.110	2.143
Ruminococcus	5.288	1.928	4.446	1.034	5.872	1.876	4.983	1.859	6.386	1.883	5.887	2.332
Robinsonella	4.570	0.981	2.527	0.883	3.273	0.898	1.512	0.775	3.820	0.847	2.242	0.912
Alkaliphilus	2.743	0.787	3.714	0.940	3.466	1.452	3.731	1.988	3.663	0.913	3.699	0.880
Blautia	2.607	0.542	2.252	1.068	3.240	1.551	2.455	1.482	3.046	0.929	1.436	0.931
Butyrivibrio	2.582	0.655	2.731	0.902	2.967	0.784	3.013	0.888	2.670	0.451	3.355	1.019
Roseburia	2.470	0.988	2.550	1.223	2.191	1.571	2.895	2.425	1.546	1.158	4.665	1.772
Bacillus	2.153	0.717	2.384	1.430	2.694	0.818	1.832	0.744	2.236	0.740	2.038	1.148
Bacteroides	2.115	1.643	9.219	3.801	1.700	0.703	9.440	2.610	2.996	1.628	0.315	0.127
Butyrivibrio	1.533	1.022	0.693	0.483	0.835	0.696	1.161	0.906	1.381	1.517	0.764	0.649
Ethanoligenes	1.392	0.588	1.445	0.388	2.247	0.804	1.797	0.338	1.743	0.286	1.835	0.644

De Cesare et al., 2019 Poultry Science in press

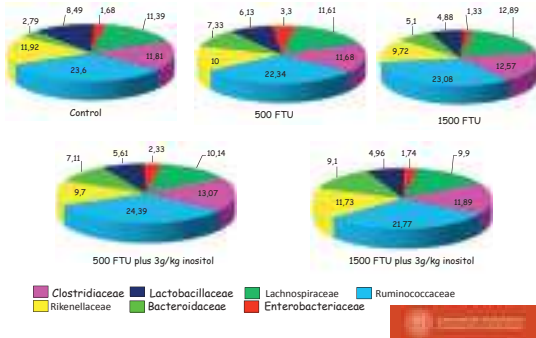
Conclusions on Dinamic of gut microbiome in chicken by using probiotic strains

Lactobacillus acidophilus D2/CSL seems to be able to colonize the crop but not the caecum. The low and high dose of *L. acidophilus* D2/CSL increased *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium saccharolyticum*, *Roseburia intestinalis*, *Lachnospiraceae* bacterium 14-2T and *Coproccocus eutactus* and *Subdoligranulum* which are *Clostridium*-related species well known to produce butyric acid protecting against pathogens in poultry. The relative frequency of abundance of pyruvate-flavodoxin oxidoreductase (EC 1.2.7.-) and β -glucosidase was significantly affected by the interaction between time and treatments. The LA supplementation produced a significant beneficial effect on body weight gain between 15-28 d and improved feed conversion rate in the overall period. Birds treated with LA showed a lower occurrence of pasty vent at both 14 and 28 d. The *Bacillus* spores provided with the cleaning treatment were able to successfully colonize the reused poultry litters, decreasing the mean counts of total aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, and coagulase positive *Staphylococci*. The decrease of Enterobacteriaceae, mainly represented by the genus *Escherichia*, was also observed in the caeca of broilers reared on reused litters treated with the cleaning product. Moreover, the treatment retained the caeca content of Ruminococcaceae and *Faecalibacterium* as well as the level of biodiversity among the bacteria genera colonizing the caeca of animals reared on reused litter. In conclusion, the LA and *Bacillus* treatments improved broiler productive performances and metabolic functions promoting animal health.

Summary

- Details on the design (sequencing)
 - Data analysis: reference based or de novo assembly
 - Key parameters to follow in metagenomic studies
- Application of metagenomics in poultry system to investigate:
 - Dynamics of gut microbiome in chicken by using probiotic strains
 - Dynamics of gut microbiome in chicken by modifying the diet composition
 - Study of safety and metabolic competence of poultry parasites by metagenomic approach
- Conclusions and future opportunities

Relative abundance (%) of most abundant Families in chicken caecum microbiota at 42 days according to different Phytase treatment



Top five Species in chicken caecum microbiota at 42 days according to the Phytase treatment

Control	Group B	Group C	Group D	Group E
Faecalibacterium prausnitzii (12.87)	Faecalibacterium prausnitzii (12.34)	Faecalibacterium prausnitzii (12.54)	Faecalibacterium prausnitzii (13.27)	Faecalibacterium prausnitzii (10.67)
Alistipes shahii (7.39)	Alistipes shahii (6.22)	Alistipes shahii (6.04)	Alistipes shahii (5.81)	Alistipes shahii (7.19)
Ruminococcaceae bacterium D16 (3.08)	Bacteroides dorei (3.21)	[Ruminococcus] torques (3.82)	Ruminococcaceae bacterium D16 (3.81)	Bacteroides dorei (5.49)
[Ruminococcus] torques (3.03)	Ruminococcaceae bacterium D16 (2.93)	Ruminococcaceae bacterium D16 (3.47)	Bacteroides dorei (3.78)	Ruminococcaceae bacterium D16 (4.09)
Alistipes finegoldii (3.02)	[Ruminococcus] torques (2.91)	uncultured bacterium (2.77)	Alistipes finegoldii (2.47)	Alistipes finegoldii (2.94)

Most abundant metabolic functions significantly reduced in chickens treated with Phytase in comparison to control

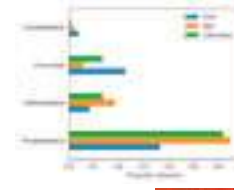
Pathways	Function	P value	Control	Group B	Group C	Group D	Group E
Glutathione metabolism	pepK, aminopeptidase N [EC:3.4.11.2]	0.031	1.857	1.131	2.045	1.161	1.308
Starch and sucrose metabolism	E2.4.1.8, mapK, maltose phosphorylase [EC:2.4.1.8]	0.012	0.742	0.396	0.473	0.495	0.445
Pyruvate metabolism	ppc, phosphoenolpyruvate carboxylase [EC:4.1.1.31]	0.016	0.652	0.323	0.350	0.379	0.275
Pyruvate metabolism	pyr, pyruvate oxidase [EC:1.2.1.3]	0.000	0.499	0.230	0.233	0.268	0.230
Pentose phosphate pathway	E1.1.1.44, PGD, gnd, 6-phosphogluconate dehydrogenase [EC:1.1.1.44]	0.014	0.457	0.189	0.211	0.211	0.170
Starch and sucrose metabolism	E3.2.1.122, g6pA, maltose-6'-phosphate glucosidase [EC:3.2.1.122]	0.044	0.453	0.230	0.169	0.282	0.228
Pathways in cancer	E4.2.1.28, fumC, fumarate hydratase, class II [EC:4.2.1.2]	0.016	0.416	0.211	0.349	0.235	0.362
Arginine and proline metabolism	E4.1.1.17, ODC1, speC, speF, ornithine decarboxylase [EC:4.1.1.17]	0.003	0.375	0.160	0.190	0.116	0.270
Lysine biosynthesis	pepK, aminotransferase [EC:2.6.1.-]	0.044	0.374	0.179	0.147	0.216	0.127
Phosphotransferase system (PTS)	PTS-Man-EIIb, manX, PTS system, mannose-specific IIB component [EC:2.7.1.69]	0.008	0.358	0.150	0.182	0.221	0.162
Phosphotransferase system (PTS)	PTS-Man-EIIa, manX, PTS system, mannose-specific IIA component [EC:2.7.1.68]	0.003	0.338	0.106	0.137	0.180	0.099
Phosphotransferase system (PTS)	PTS-Ad-EIIc, g6pA, PTS system, arbutin-like IIB component [EC:2.7.1.60]	0.010	0.331	0.139	0.164	0.170	0.110
Phosphotransferase system (PTS)	PTS-Ad-EIIC, g6pA, PTS system, arbutin-like IC component	0.010	0.325	0.130	0.121	0.155	0.098
Arginine and proline metabolism	ppc, proline iminopeptidase [EC:3.4.11.5]	0.001	0.325	0.130	0.121	0.155	0.098

Effect of low protein diet on chicken caecum microbiota and production performance

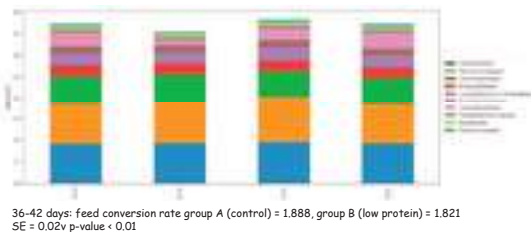
1100 one day old male Ross 308 chicks

- Control (A): corn-soybean basal diet
- Treated (B): corn-soybean basal diet - 7% crude protein

Sampling of the caecum contents: day 14 and day 42



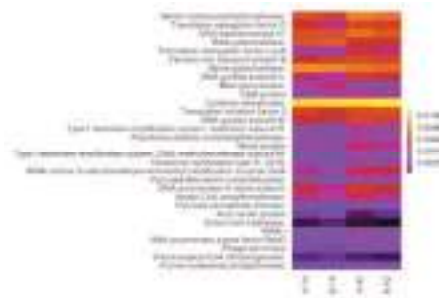
Shifts in the 10 most abundant families in the basal diet (A) and in the low protein diet (B) at 14 and 42 days



Species of Firmicutes contributing to ≥ of the differences between microbiomes associated to chickens fed the basal diet (diet A) and the low protein diet (diet B) at 14 (A) and 42 (B) days



Heatmap showing the average relative abundance of metagenomic reads annotated to SEED Subsystems (Function)



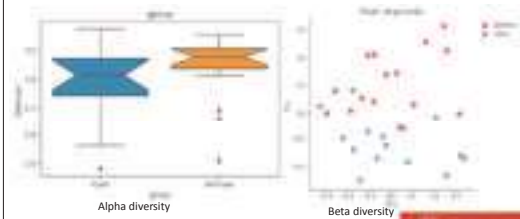
Conclusions on Dynamic of gut microbiome in chicken by modifying the diet composition

- Bacteria species statistically significant different in treated and control groups were:
 - Lactobacillus johnsonii* ; *Ruminococcus torques*; *Lactobacillus crispatus, helveticus* and *acidophilus* ; *Clostridium saccharolyticum*; *Butyrate producing bacterium SL7/1*
- A higher abundance of Bacteroidetes was observed in the microbiota composition of the birds belonging to the phytase groups. On the contrary a higher abundance of Lactobacillaceae was observed in the microbiota composition of the birds belonging to the low protein which displayed a better feed conversion rate
- The diversified microbiota composition in the birds analyzed in this trial could represent a significant barrier against the pathogens colonization through the creation of niches and nutrient competition.
- The metabolic functions significantly different between control and treated groups were higher in the control and most of them were related to starch and sugar pathways as well as amino acid metabolism.
- The study of low protein showed that a reduced intake of crude protein in broilers increases the abundance of Lactobacillaceae in the caeca over time and this seems to be linked to a better feed conversion rate between 36 and 42 days. A reduced intake of crude protein in chicken production can help to improve exploitation of edible resources, while reducing the emission of nitrogen pollutants in the environment.

Summary

- Details on antibiotic sequencing
 - DNA analysis reference based vs de novo assembly
 - Exp generated by follow metagenomic studies
- Applications of metagenomics in poultry systems to investigate:
 - Dynamics of gut microbiome in chicken by using a probiotic strains
 - Dynamics of gut microbiome in chicken by modifying the diet composition
 - Study of safety and microbiota composition of poultry carcasses by metagenomic approach
- Challenges and future opportunities

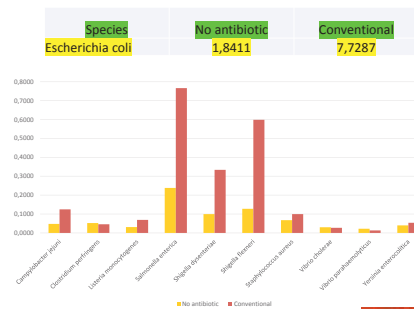
Alpha and Beta diversity for bacterial genera in broiler carcasses from conventional and antibiotic free farms

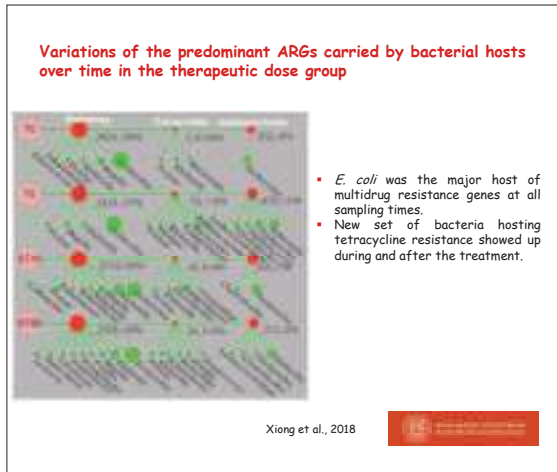
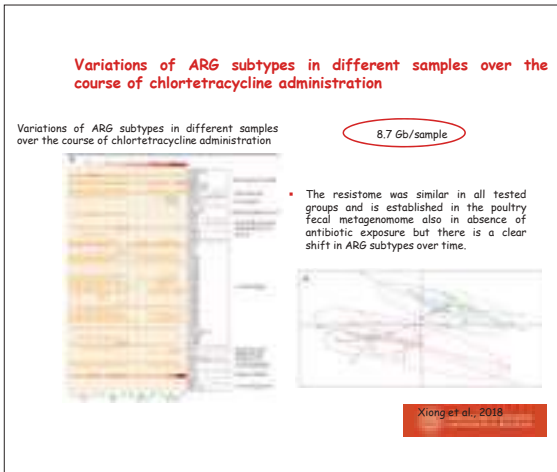
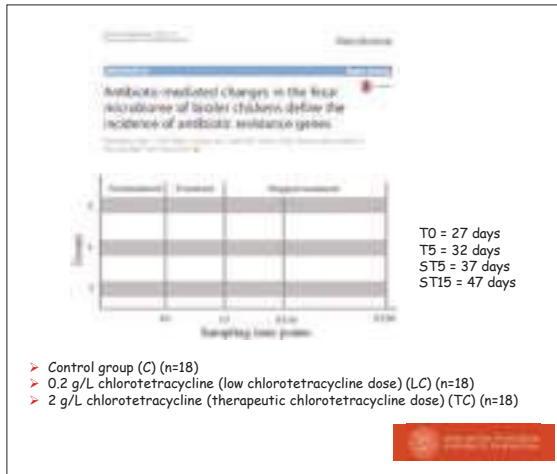
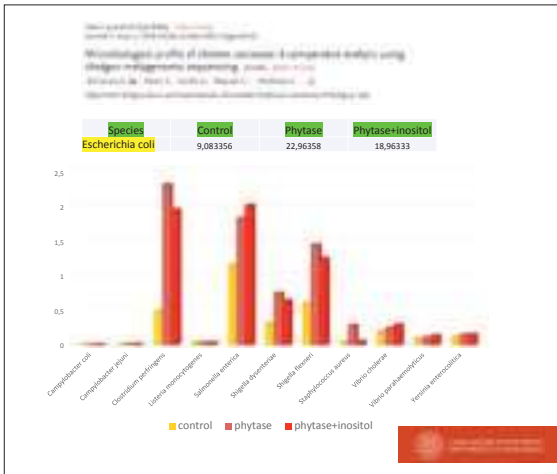


Shift of bacterial genera with abundance >1% in broiler carcasses from conventional and antibiotic free farms

	No antibiotic	Conventional
Acidovorax	-	+
Ainetobacter	+	-
Anoxybacillus	-	+
Bacillus	-	+
Bacteroides	+	-
Bifidobacterium	-	+
Citrobium	+	-
Clostridium	+	-
Escherichia	-	+
Geobacillus	-	+
Lactobacillus	-	+
Parabacteroides	+	-
Propionibacterium	+	-
Pseudomonas	-	+
Psychrobacter	-	+
Rhodococcus	+	-
Ruminococcus	+	-
Shigella	-	+
Stenotrophomonas	-	+
Xanthomonas	-	+

Identification of potential foodborne pathogens and relative abundance in broiler carcasses from conventional and antibiotic free farms





Variation of resistant genes in broiler carcasses from conventional and antibiotic free farms identified by metagenomic sequencing

Resistant genes	No antibiotic Mean	Conventional Mean
Multidrug Resistance Efflux Pumps	+	-
Resistance to fluoroquinolones	-	+
Multidrug efflux pump in <i>Campylobacter jejuni</i>	+	-
Methicillin resistance in <i>Staphylococci</i>	-	+
The mdtABCD multidrug resistance cluster	-	+
Beta-lactamase	-	+
Erythromycin resistance	+	-
MexE-MexF-OprN Multidrug Efflux System	-	+
Resistance to Vancomycin	+	-
Streptothricin resistance	-	+
Aminoglycoside adenyltransferases	-	+
Multidrug Resistance Operon mdtRP of <i>Bacillus</i>	-	+
Multiple Antibiotic Resistance MAR locus	-	+

Variation of resistant genes, in comparison to control group, in broiler carcasses of phytase and phytase+inositol groups

	Phytase	Phytase + inositol
Bacitracin resistance response regulator BceR	+	-
Bacitracin resistance sensor histidine kinase BceS	+	-
Multidrug resistance protein K	+	+
MFS transporter, multidrug resistance protein Y	+	+
Methicillin resistance regulatory protein	=	+
Methicillin resistance protein	+	+
Vancomycin resistance associated response regulator VraR	+	+
Vancomycin resistance sensor histidine kinase VraS	+	-
Glycopeptide antibiotics resistance protein	+	+
Inner membrane protein involved in colicin E2 resistance	+	+
Multidrug resistance efflux pump	-	-

Conclusions

- Before starting a food metagenomic project it is crucial to define the aims to select the appropriate sequencing strategy (target vs shotgun).
- For metagenomics, 7 Gb/sample should be the sequencing output to look at gene contents with relative abundance >1%.
- Metagenomics show the effect of specific antibiotics on sample resistome and support the identification of bacteria hosting specific ARGs within microbial communities.
- Microbiome of carcasses provides useful information in terms of microbiological profile to be used in food safety assessments but should be analyzed with care in terms of correlation with bacteria concentration.
- Besides the detection of pathogens achieved by enrichment, more studies should focus on strategies to improve nucleic acid extraction (which should be equally efficacious for Gram positive and Gram negative), library preparation and sequencing coverage to detect all pathogens in the sample without changing their real concentration.
- At this time metagenomic analysis can not be listed among the testing methods for regulatory purposes because its sensibility must be still defined.



Future opportunities

- When metagenomics sequencing will be improved as stated above being able to detect all pathogens in a food sample, providing information also on their serotype, antibiotic resistance profile, virulence properties, etc. its cost will be comparable with that of the ISO methods.
- The current sequencing methodologies, including metataxonomic and metagenomics, do not allow serotype discrimination for epidemiological investigations.
- Our understanding of the food microbiome keeps evolving very quickly but practical applications of this knowledge are still missing.
- There is a lack of high resolution studies with solid statistic power either in number of samples and time points to build predictive models of the food microbiome dynamics with a main focus on inhibition of foodborne pathogens.
- Standard procedures for all sequencing pipeline are still missing



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA
UNIVERSITY OF BOLOGNA

Gerardo Manfreda

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari
Centro Interdipartimentale per la Ricerca Industriale Agroalimentare*

gerardo.manfreda@unibo.it
<http://www.unibo.it/en>
<http://www.agroalimentare.unibo.it/en>

www.unibo.it

FIELD EXPERIENCE ON THE USE OF A MULTI-SPECIES SYNBIOTIC ON GUT HEALTH AND PRODUCTION PARAMETERS IN BROILER BREEDERS AND THEIR PROGENY

Prentza Z.¹, Franzo G.², Castellone F.³, Cecchinato M.², Koutoulis K.¹

¹*Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Karditsa, Greece*

²*Department of Animal Medicine, Production and Health, University of Padua, Legnaro, Italy*

³*Biomin GmbH, Getzersdorf, Austria*

Antibiotics have been extensively used as growth promoters for enhancing poultry production for more than fifty years. Despite their long success, antibiotics are currently under the spotlight due to the emergence of multidrug-resistant bacteria. To achieve a successful, profitable and safe poultry production, an investment in prevention strategies alongside the use of alternative treatments is mandatory. Synbiotics are considered of particular interest as alternative health promoters in the fight against bacterial resistance. PoultryStar® sol is a well-defined, poultry-specific, multi-species synbiotic product that promotes a beneficial gut microflora through the combined action of carefully selected probiotic microorganisms and prebiotic fructooligosaccharides. The aim of this study was to evaluate the beneficial effect of the synbiotic product on gut health and the production parameters in Broiler Breeder birds and their progeny. Field trials were conducted in two steps. The first part was carried out in a Ross 308 Broiler Breeder farm from day old to 40 weeks of age. Houses A and B received PoultryStar® according to a protocol and C acted as a control. Ten birds from each group were randomly sampled at 15, 25 & 40 weeks of age and live body weight of the birds and Bacterial Enteritis (BE) score were recorded. Duodenum, jejunum, ileum-cecum, were also sampled. At the beginning of the laying period and every 2 weeks, 20 eggs per group were collected and analyzed for egg quality parameters. Egg production data were fully recorded throughout the study. Results of our study showed a decrease BE score, an improvement of gut morphometric parameters, livability during the growing and laying period, and hatchability in treated groups. Eggshell quality was similar in all groups. The second part comprised field trials that were conducted to the progenies of Broiler Breeder (BB) flock already treated with the same synbiotic product. Day-old chicks hatched from BB-synbiotic treated eggs laid at the age of 30, 35 and 40 weeks, were placed in 3 different broiler farms. Broilers were reared from Day-old to 42 days of age. In each broiler farm, house A received PoultryStar® according to the given protocol and house B acted as a control. Ten birds from each house were randomly sampled at 10, 28 & 38 days of age and Bacterial Enteritis (BE) score was recorded. Duodenum, jejunum, ileum-cecum, were sampled at 38 days. Body weights and mortality were recorded weekly and daily respectively and performance parameters were assessed at the end of the trial. Results showed improved intestinal health, increased body weight, and improved feed conversion ratio, in all progenies treated with the symbiotic product as well as reduced skeletal disorders and mortality. In conclusion, our study showed that PoultryStar® is a safe product during the laying period. Furthermore, improved performance and health status that might be linked with ameliorating intestinal integrity were observed either in BB and Broiler.



HOW CAN PROBIOTICS AFFECT BIRDS AND THEIR MICROBIOME IN COMMERCIAL POULTRY PRODUCTION?

Petri D.

Global Product Line Manager – Microbials, BIOMIN Holding GmbH, Austria


Microbiota: Perspectives & Applications In the Poultry Production Chain



Dr. Daniel Petri


Naturally ahead

Poultry Gut Microbiota – What is the relevance?



BIOMIN

Without AB → Need for stricter Biosecurity




- Building or other material – clean and keep to dry out
- DOC and Parent Stock – Pathogens free
- Clean feed and disinfected water lines
- People – Control of people coming in and out, change to farm attire, foot dips in disinfect foot and hand sanitizing
- Vehicle and farm equipment – Disinfect, cleaning and disinfection of equipment by a road, can wash the equipment when entering the farm site
- Pest control – Transmission of non desired pathogens from rodents to chickens, control of cats and feral dogs
- Unused storage bins – Remove and clean, unused storage as they can be a source of pathogens and transmission vectors
- Poultry House – cleaning and disinfection
- End product – should leave the farm pathogen free

Naturally ahead

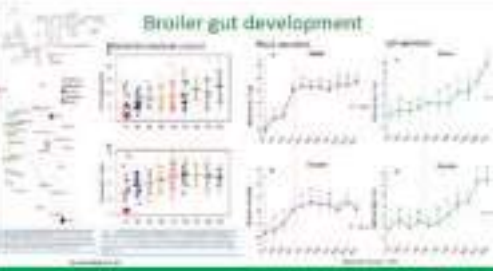
Disinfection

- Disinfectant kills pathogenic bacteria
- INCLUDING environmental bacteria essential for gut development → see "hygiene hypothesis"



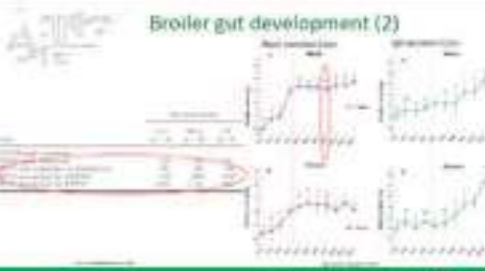
Naturally ahead

Broiler gut development



BIOMIN

Broiler gut development (2)



BIOMIN

Microbiota driving gut health

Summarized by FAO, 2019

Properties, definition and classification

Nature's ahead

Leaky gut causing lameness

Bacterial Translocation

Stress - Corticosterone

BDL Pathogenesis - Gut-liver Interactions

Nature's ahead

Leaky gut causing lameness – how to prevent it?

BDL Response to Colonizing L48 A Bifidobacterium

Transient bacteria are not effective against BDL

Nature's ahead

Colonizing bacteria, immune-modulation and cocci-vaccination

Nature's ahead

Effect of colonizing bacteria supplementation on layer production and cecal *Salmonella* load during a *Salmonella* challenge USA-OSU

Before challenge:

After challenge:

Adapted Figure 7. Effect of symbiotic supplementation on SE cecal content load on day 4 post *Salmonella* challenge.

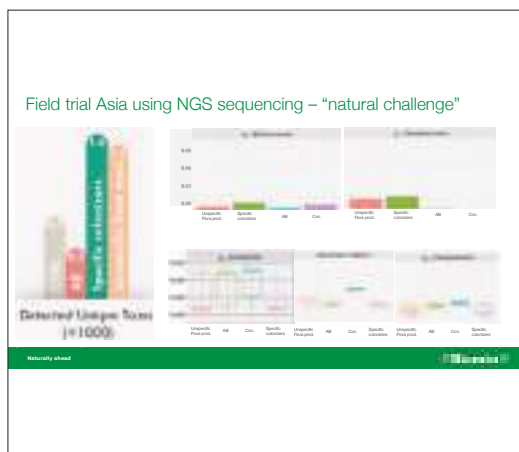
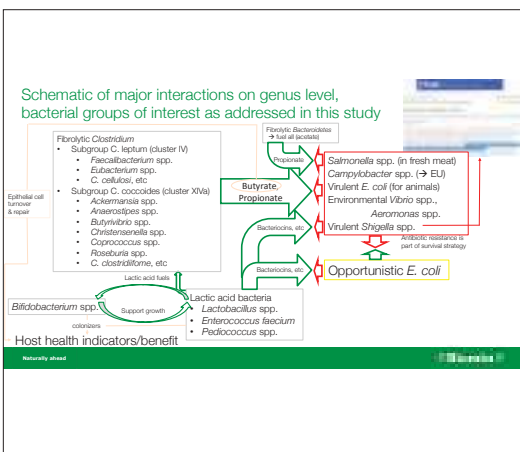
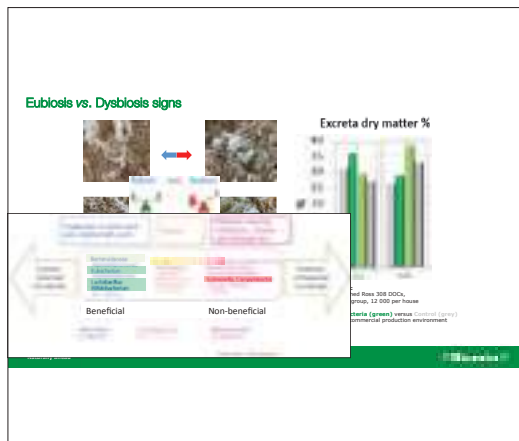
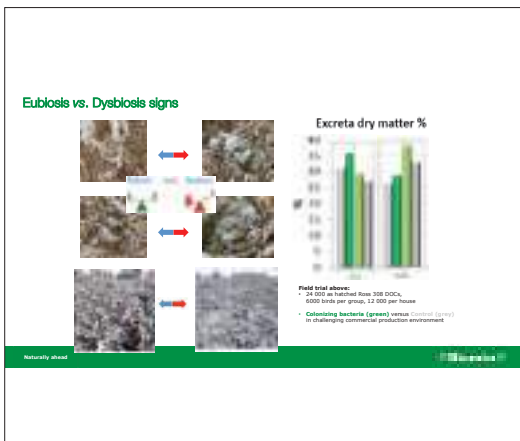
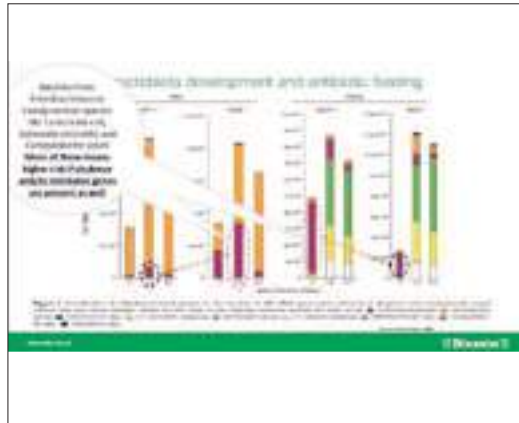
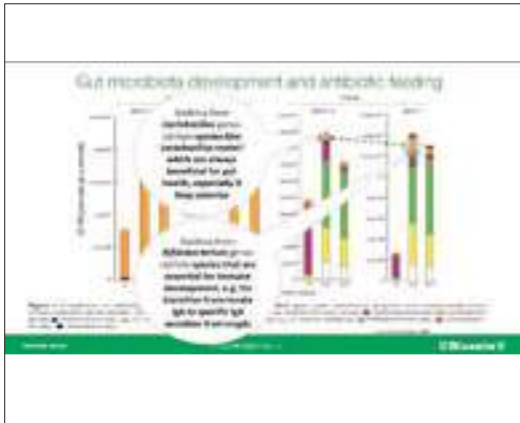
Figure 2. Effect of symbiotic supplementation on weekly hen day egg production (HDEP) pre-*Salmonella* challenge.

Figure 3. Effect of symbiotic supplementation on weekly hen day egg production (HDEP) post-*Salmonella* challenge.

Nature's ahead

Gut microbiota development and antibiotic feeding

Nature's ahead



Field trial Asia using NGS sequencing – “natural challenge”



Note: Antibiotic resistance gene quality and quantity shows the same picture.

Naturally ahead



Summary

- Gut microbiota are essential for poultry production, and at the same time biggest risk factor as they are reservoir for virulence and resistance genes
- Specific bacteria are needed for animal development, as well as to mediate the ability for the bird's immune system to “accept” vaccinations (e.g. layers, broiler breeders)
- Only a minority are pathogens, most are opportunistic bacteria and harmless when balanced with commensal “neutral” flora and beneficial bacteria
- Fast growing birds are at higher risk of translocation of opportunistic bacteria, resulting e.g. in lameness
- Breeding animals in excellent hygiene conditions are at higher risk of unspecific diseases due to underdeveloped immune system or to tolerate colonization of unwanted bacteria (e.g. *Salmonella*, *Campylobacter*)
- If unwanted bacteria like *Salmonella* can colonize breeders and escape the gut, they can translocate into eggs and be passed on to the next generation (hatchery sanitation useless), and can pass on genetic elements like virulence and resistance genes
- If human pathogens are present in birds raised for human consumption, biosecurity and bacterial preventative colonization management are the most important tools to assure safe food

Naturally ahead



Microbiota: Perspectives & Applications in the Poultry Production Chain



Dr. Daniel Petri

Naturally ahead



ATTI DEL IV SIMPOSIO SCIENTIFICO

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Bologna, 22 Novembre 2019



ESPERIENZE DI CAMPO DOPO SOMMINISTRAZIONE DI UN VACCINO BATTERICO E.COLI VIVO

Alberti S., Cookson K., Weber R.

I coli patogeni per il pollame intervengono quali patogeni secondari dopo altre cause eziopatogenetiche aggravando la sintomatologia e il danno agli animali.

In una situazione che vuole la produzione avicola sempre meno propensa all'utilizzo di antibiotici il controllo di questi patogeni con metodi preventivi è sempre più di grande interesse.

Diverse esperienze in Germania indicano che l'uso di Poulvac E.coli un vaccino vivo *E. coli* O78 permette di diminuire sensibilmente l'uso di antibiotici e far rientrare gli allevamenti in una situazione di uso prudente degli antibiotici. Recentemente è stato visto in USA che anche a fronte di infezioni di nuovi ceppi bronchite non coperti dalle vaccinazioni oggi disponibili, l'uso del vaccino vivo Poulvac E.coli ha permesso di controllare le infezioni secondarie in gruppi di broiler e un ritorno dell'investimento del gruppo.

In Italia ulteriori esperienze in animali da carne in allevamenti, che presentavano storicamente infezioni secondarie da *E. coli*, hanno evidenziato come l'uso del vaccino Poulvac E.coli possa permettere piccoli miglioramenti nelle performance del gruppo, riduzione della mortalità, dello scarto che portano una riduzione dei costi ed un vantaggio economico dei gruppi vaccinati.

Tutte queste esperienze evidenziano come in differenti situazioni geografiche ed epidemiologiche le osservazioni siano simili e l'uso di Poulvac E.coli contribuisca controllando le infezioni secondarie da *E. coli* ad un contenimento dei costi economici e una riduzione dell'uso degli antibiotici.



SORVEGLIANZA ATTIVA PER INFLUENZA AVIARIA NEI VOLATILI SELVATICI NEL NORDEST ITALIA: RISULTATI ATTIVITÀ 2017-2018

Azzolini A.¹, Fornasiero D.¹, Scolamacchia F.¹, Gobbo F.², Salviato A.³, Cunial G.¹, Dalla Costa A.¹, Di Martino G.¹, Terregino C.^{2,3}, Mulatti P.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS4 - Epidemiologia Veterinaria - Viale dell'Università 10, 35020 - Legnaro (Pd)*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS6 - Virologia speciale e sperimentazione - Viale dell'Università 10, 35020 - Legnaro (Pd)*

³*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS5 - Ricerca e Innovazione - Viale dell'Università 10, 35020 - Legnaro (Pd)*

Summary

Wild aquatic birds are considered the natural reservoir of avian influenza (AI) viruses, posing a continuous threat for their direct and indirect introduction of into the domestic poultry sector. Novel Avian Influenza viruses are known to be introduced by migratory birds; however, the role of residential wild bird populations is still not completely understood, although they could be related with the maintenance, amplification and local spread of AI viruses. Following the H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) of 2016-2018, the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie drafted some ancillary active surveillance measures for AI in wild populations, to complement the passive surveillance already in force. Hereby the results of activities carried out in between 2017 and 2018 are shown, with the aim of deepening the knowledge on the circulation of AI viruses in both migratory and residential wild birds in Northeast Italy.

INTRODUZIONE

La sorveglianza passiva è la principale strategia attuata in Italia per l'individuazione di virus influenzali circolanti in popolazioni di volatili selvatici. Questo tipo di sorveglianza si basa sul rilevamento in campo di esemplari di volatili morti, o con sintomatologia clinica associabile ad Influenza Aviaria (IA).

La sorveglianza passiva risulta uno strumento efficace nell'individuazione di circolazione di virus ad alta patogenicità, data l'alta mortalità della malattia (Breed et al., 2012, DeLiberto et al., 2009, Knight-Jones et al., 2010). Il successo di questa strategia dipende dalla rapida capacità di mettere in evidenza i nuovi casi, dall'efficienza di spedizione dei campioni ai laboratori diagnostici qualificati, alle tempestive analisi, alla segnalazione immediata dei risultati diagnostici e alla veloce implementazione di protocolli prestabiliti in caso di positività. Il principale limite di questo approccio, tuttavia, è legato al fatto che la maggior parte degli eventi di morbilità e mortalità possano passare inosservati se coinvolgono pochi soggetti, o se avvengono in aree poco frequentate dagli esseri umani, o possono non risultare utili ai fini diagnostici in caso di predazione o decomposizione delle carcasse (DeLiberto et al., 2009). Un altro importante limite consiste nella difficoltà di utilizzare la sorveglianza passiva per individuare la circolazione di ceppi di IA a bassa patogenicità, con bassa mortalità e individui asintomatici (Baumer et al., 2010; Flint et al., 2015; Galletti et al., 2018; Breed et al., 2012; Hjulsgaard et al., 2012).

I limiti della sorveglianza passiva evidenziati in letteratura sono emersi anche nel contesto dell'epidemia di IA ad alta patogenicità (HPAI) sostenuta dal ceppo virale H5N8, re-

sponsabile di 83 focolai negli allevamenti domestici tra il 2016 e 2018, principalmente nelle regioni del nord Italia. Come suggerito dallo scarso numero di casi individuati nei volatili selvatici, confronto a quanto osservato negli altri stati europei (Verhagen et al., 2017; Mulatti et al., 2018), le attività di sorveglianza sono verosimilmente risultate non ottimali per la valutazione della circolazione virale nella popolazione selvatica. L'inefficacia del sistema è probabilmente dovuta alla mancanza di precise e uniformi istruzioni operative sulle modalità di raccolta, conservazione e consegna dei volatili trovati morti per la ricerca dei virus. Le carenze evidenziate nel sistema di sorveglianza passiva impongono la necessità di strutturare in maniera sistematica i piani di campionamento per l'avifauna selvatica, tenendo in considerazione: le popolazioni stanziali, i periodi di migrazione, e l'ecologia delle diverse popolazioni di volatili acquatici selvatici presenti sul territorio. Per questo motivo, tra il 2017 e 2018 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) ha pianificato ed attuato una serie di attività volte ad intensificare la sorveglianza per IA nelle popolazioni di volatili selvatici presenti in Italia. Queste attività rientrano in programmi di sorveglianza attiva per la valutazione della circolazione di virus influenzali nell'avifauna acquatica migratoria e nelle popolazioni dei selvatici stanziali, oltre ad un programma di campionamento ambientale di raccolta di feci fresche.

MATERIALI E METODI

Sorveglianza attiva per IA nell'avifauna acquatica migratoria

La sorveglianza attiva nell'avifauna acquatica migratoria è stata basata su campioni raccolti da volatili selvatici abbattuti durante attività venatorie. Il campionamento è stato condotto tra il 2017 e il 2019 in alcune valli da pesca della Provincia di Rovigo (Porto Levante, Porto Viro e Porto Tolle), nel corso delle stagioni di caccia (tra settembre e gennaio), con frequenza settimanale. Su ciascun volatile cacciato è stato effettuato un tampone oro-tracheale e un tampone cloacale. Le attività di prelievo sono state svolte dal personale dell'IZSVe con il supporto operativo di Federcaccia, in collaborazione con la Provincia di Rovigo.

I campioni sono stati trasportati a temperatura controllata nell'arco della stessa giornata di prelievo, e successivamente conservati in congelatore a -80°C. La processazione dei campioni raccolti comprendeva uno *screening* iniziale mediante rRT-PCR specifica per l'individuazione del gene M, per individuazione di virus influenzali di tipo A. I campioni positivi sono stati successivamente sottoposti a rRT-PCR specifiche per identificare eventuali ceppi H5, H7 e H9. Per i sottotipi H5 e H7 è stata inoltre effettuata l'analisi del sito di clivaggio al fine di determinare il tipo di patogenicità (bassa o alta). I campioni risultati positivi alle indagini molecolari sono stati successivamente destinati all'isolamento virale in uova embrionate di pollo.

Sorveglianza attiva per IA nell'avifauna acquatica stanziale

Nel corso del 2018, l'IZSVe ha avviato una collaborazione con l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) per definire attività di sorveglianza al fine di valutare la prevalenza di virus influenzali circolanti nelle popolazioni di anatidi selvatici residenziali nel nord-est Italia. Le attività sono state condotte tra luglio e settembre, periodo a limitata presenza di anatidi migratori nella zona di studio.

Con il supporto di ISPRA, sono state individuate cinque zone umide idonee al posizionamento di trappole per la cattura e il campionamento di volatili acquatici selvatici. Le

aree scelte per le catture dei volatili e i successivi campionamenti sono: Valle Cavallino (VE), Valle Morosina (PD), Oasi del Busatello (VR), Valle di Campotto (FE) e Cave Danesi (CR).

Le trappole installate in ciascuna valle sono state controllate con cadenza settimanale da ornitologi qualificati, e su ciascun individuo catturato sono stati effettuati tamponi cloacali e oro-tracheali per la ricerca dei virus dell'IA, come precedentemente descritto.

Sorveglianza per IA tramite campionamento ambientale

La raccolta di campioni ambientali è stata condotta in Valle Figheri (Campagna Lupia, in Provincia di Venezia), territorio già interessato in precedenza dalla circolazione di virus HPAI H5N8, nel corso dell'epidemia del 2016-2017. Le attività si sono svolte nel periodo compreso tra marzo e ottobre 2018, mesi caratterizzati dalla commistione di specie selvatiche migratorie e stanziali sullo stesso territorio. Nel corso dei sopralluoghi sono stati prelevati campioni di feci fresche in provette sterili da 50 ml e successivamente trasportati refrigerati presso i laboratori dell'IZSVE per le successive analisi. Queste prevedevano lo stesso protocollo sopra descritto per i campioni provenienti da tamponi cloacali e tracheali; in aggiunta, sulle stesse matrici fecali sono stati condotti test molecolari per l'identificazione delle specie aviarie, in modo tale da raccogliere informazioni utili per lo studio delle dinamiche di popolazione e dell'ecologia dei virus influenzali sul territorio.

RISULTATI

Durante le stagioni di caccia 2017-18 e 2018-19, sono state organizzate 12 giornate di campionamento in sette diverse valli da pesca nella Provincia di Rovigo. In totale 1912 campioni costituiti da tamponi tracheali e cloacali sono stati raccolti e analizzati (Tabella 1). Complessivamente, 55 campioni (pari al 2,9% del totale di tamponi cloacali e tracheali) sono risultati positivi per presenza di virus influenzale tipo A (gene M). Tra questi, sono stati identificati 7 campioni positivi per il sottotipo H5, 2 per il sottotipo H7 e 4 per l'H9, tutti a bassa patogenicità.

Tabella 1. Positività dei campioni (tamponi tracheali e cloacali) raccolti da volatili cacciati e analizzati nel corso del 2018

Luogo del prelievo	Totale campioni	Influenza A (gene M)	Positivi H5	Positivi H7	Positivi H9
Boccasette - Porto Tolle	98	7	2	0	1
Ca' Pasta - Porto Viro	584	19	4	1	1
Ca' Zuliani - Porto Tolle	180	13	1	0	1
Ca' Sacchetta - Porto Levante	672	10	0	1	0
Valchiusa - Porto Tolle	240	3	0	0	1
Ca' Pisani - Porto Viro	88	2	0	0	0
Valle Spolverina - Porto Tolle	50	1	0	0	0
Totale	1912	55	7	2	4

Le attività di campionamento svolte nel corso del 2018 sull'avifauna acquatica stanziale hanno permesso di raccogliere campioni da un totale di 591 individui (Tabella 2). A causa di alcuni problemi tecnici legati al corretto posizionamento ed attivazione delle trappole, la cattura dei volatili è stata svolta principalmente durante il mese di agosto. Le specie più frequentemente campionate sono state la marzaiola (*Anas querquedula*, per un totale di 274 soggetti) ed il germano reale (*Anas platyrhynchos*, per un totale di 260 soggetti).

Sono risultati positivi per virus influenzali un totale di 29 tamponi oro-tracheali (4,9% dei tamponi tracheali totali) e 59 tamponi cloacali (10% dei tamponi cloacali totali). Solo due tamponi cloacali (0,34%) hanno dato esito positivo per presenza di virus sottotipo H9, mentre nessun campione è risultato positivo per H5 e H7 (Tabella 3).

Tabella 2. Numero di volatili selvatici campionati per sito di cattura nel 2018

Luogo	Specie	Numero
Valle Cavallino/ Valle Morosina	Gallinella d'acqua	1
	Germano reale	187
	Marzaiola	274
	Alzavola	13
Oasi Busatello	Gallinella d'acqua	12
	Germano reale	50
Valle dell'Oglio	Alzavola	8
	Folaga	6
	Gallinella d'acqua	17
	Germano reale	18
Valli di Campotto	Germano reale	5
	Totale	591

Tabella 3. Esito degli esami virologici eseguiti sui campioni raccolti nell'ambito del piano pilota di sorveglianza attiva per AI negli anatidi selvatici residenziali

Specie	Tamponi oro-tracheali				Tamponi cloacali			
	Influenza virus A	H5	H7	H9	Influenza virus A	H5	H7	H9
Alzavola	0	-	-	-	2	0	0	0
Germano reale	7	0	0	0	38	0	0	1
Marzaiola	22	0	0	0	19	0	0	1

Nel periodo compreso tra la metà di marzo e la metà di ottobre 2018, sono stati raccolti un totale di 1881 campioni ambientali (feci) nel corso di 13 giornate di campionamento, nel territorio di Valle Figheri (VE). Sedici campioni (0,9% del totale dei campioni ambientali) sono risultati positivi per il Influenzavirus A, e solo un

campione (1/1881; 0,06%) è risultato positivo per H7. La fase di sviluppo, validazione ed implementazione di test molecolari per l'identificazione di specie di volatili selvatici, ha permesso di arrivare all'automatizzazione della procedura di estrazione degli acidi nucleici e messa a punto di nuovi protocolli. I risultati ottenuti hanno permesso di processare 399 campioni dei 1881 raccolti. In particolare, i lotti sottoposti ad analisi sono stati quelli corrispondenti alle ultime 4 giornate di campionamento di questo studio, fra fine agosto ed inizio ottobre 2018. Le specie identificate e la relativa numerosità sono riportate in Tabella 4. Dei 399 campioni processati ed analizzati ne sono stati identificati il 76% (n = 305), il 3% (n = 11) è risultato non sequenziabile, mentre per il restante 21% (n = 83) non è stato possibile risalire alla specie esatta.

Tabella 4. Specie identificate e relativa numerosità nei campioni processati

Specie	N. campioni identificati	Percentuale campioni identificati
Oca selvatica (<i>Anser anser</i>)	201	66%
Germano reale (<i>Anas platyrhynchos</i>)	38	12%
Fagiano (<i>Phasianus colchicus</i>)	3	1%
Alzavola (<i>Anas crecca</i>)	2	1%
Oca lombardella (<i>Anser albifrons</i>)	2	1%
Canapiglia (<i>Anas strepera</i>)	58	19%
Totale campioni identificati	304	100%

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La raccolta di tamponi durante la stagione venatoria (settembre – gennaio) coincide con un'elevata presenza di volatili migratori nelle aree di studio. I risultati ottenuti sembrano indicare una continua circolazione di ceppi influenzali nei migratori con il conseguente rischio di *spill-over* verso le popolazioni stanziali e/o verso allevamenti di pollame. Il rafforzamento dell'attività di sorveglianza sui volatili cacciati permetterebbe di acquisire maggiori informazioni sulla circolazione dei virus influenzali nei volatili selvatici migratori. Tali informazioni potrebbero essere utilizzati per valutare qualitativamente il rischio di introduzione sul territorio nazionale di virus dell'influenza aviaria.

Le misure di sorveglianza attiva nelle popolazioni selvatiche stanziali, sono da considerarsi una fase pilota avviata con lo scopo di testare l'applicabilità delle misure previste, e numerose criticità sono state riscontrate, soprattutto di carattere logistico, che hanno portato a ritardare l'inizio delle attività e alla conseguente raccolta di un numero di campioni insufficiente per acquisire informazioni attendibili sulla circola-

zione del virus. Le conoscenze acquisite hanno però permesso di rimodulare il piano per il 2019, anticipando il momento di posizionamento delle trappole e l'inizio delle attività di pasturazione con il conseguente aumento dello sforzo di campionamento. Per il 2019 inoltre è in fase di definizione l'ampliamento dell'area di studio, incrementando il numero di trappole installate nelle zone a rischio. Questo permetterebbe di studiare con successo la prevalenza dei virus influenzali nelle popolazioni stanziali, fornendo importanti informazioni circa la possibilità di amplificazione dell'influenza aviaria nelle popolazioni selvatiche locali e della potenziale diffusione della malattia.

La raccolta e l'analisi di campioni fecali è già stata utilizzata in attività di sorveglianza nelle popolazioni di uccelli selvatici (Lee et al. 2010; Pannwitz et al. 2009). I vantaggi principali di questo metodo sono la facilità di raccolta di un notevole numero di campioni senza dover catturare i soggetti, con un conseguente abbattimento dei costi di campionamento. La valle selezionata è stata utilizzata per una prima fase pilota, al fine di definire e testare le metodiche di analisi. Si valuterà nel corso dei prossimi mesi se estendere l'area di studio. I test virologici e molecolari sviluppati ed applicati ai campioni ambientali raccolti hanno permesso di acquisire informazioni sulle dinamiche di circolazione dei virus influenzali nei volatili selvatici, e di identificare con discreto successo le specie eliminatrici. Per avere dei protocolli maggiormente performanti e in grado di identificare il maggior numero di ospiti, sarebbe auspicabile testare ulteriori campioni di feci in modo tale da migliorare il processo di identificazione delle specie maggiormente associate all'introduzione e al mantenimento di virus influenzali nelle aree di studio.

Le attività di sorveglianza implementate tra il 2017 e il 2018 hanno permesso di acquisire informazioni utili circa le dinamiche di circolazione dei virus influenzali nei volatili selvatici. Sebbene misure di sorveglianza passiva siano insostituibili nell'ottica di definizione di sistemi di *early detection* e *early warning* per l'introduzione di ceppi influenzali ad alta letalità o con sintomatologia molto evidente, le attività dei tre studi pilota possono considerarsi come misure ancillari, da realizzarsi in maniera mirata sia nel tempo che nello spazio. I risultati osservati indicano una prevalenza molto bassa di circolazione virale, il che comporta numerosità campionarie elevatissime al fine di escludere (o individuare) la presenza di malattia attraverso misure di sorveglianza attiva. Tuttavia il loro utilizzo potrebbe essere circoscritto ai periodi migrazione e alle zone umide a maggiore attrattività per i volatili migratori. L'applicazione delle misure dovrebbe quindi essere preceduta da un'attenta analisi di rischio, e da studi di *horizon scanning* per valutare la situazione epidemiologica in altri Paesi, e l'effettiva probabilità di introduzione di nuovi ceppi virali.

BIBLIOGRAFIA

1. Baumer A, Feldmann J, Renzullo S, Müller M, Thür B and MA Hofmann. (2010). Epidemiology of Avian Influenza Virus in Wild Birds in Switzerland Between 2006 and 2009. *Avian Dis.* 54: 875–884.
2. Breed AC, Irvine RM, Duncan D, Rae D, Snow L, Cook AJC and IH Brown. (2012). An Evaluation of Wild Bird Avian Influenza Surveillance in Great Britain. *Avian Dis.* 56: 986–991.
3. DeLiberto TJ, Swafford SR, Nolte DL, Pedersen K, Lutman MW, Schmit BB, Baroch JA, Kohler DJ and A Franklin. (2009). Surveillance for highly pathogen-

- ic Avian Influenza in wild birds in the USA. *Integr. Zool.* 4: 426–439.
4. Flint PL, Pearce JM, Franson JC and DV Derksen. (2015). Wild bird surveillance for highly pathogenic Avian Influenza H5 in North America. *Virology* 12.
 5. Galletti G, Santi A, Guberti V, Paternoster G, Licata E, Loli Piccolomini L, Procopio A and M Tamba. (2018). 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.* 65: 1033–1038.
 6. Hjulsgaard CK, Breum SØ, Trebbien R, Handberg KJ, Therkildsen OR, Madsen JJ, Thorup K, Baroch JA, DeLiberto TJ, Larsen LE, and PH Jørgensen. (2012). Surveillance for Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Denmark and Greenland, 2007–10. *Avian Dis.* 56: 992–998.
 7. Knight-Jones TJD, Hauser R, Matthes D and KDC Stark. (2010). Evaluation of effectiveness and efficiency of wild bird surveillance for Avian Influenza. *Vet. Res.* 41: 50.
 8. Lee DH, Lee HJ, Lee YJ, Kang HM, Jeong OM, Kim MC, Kwon JS, Kwon JH, Kim CB, Lee JB, Park SY, Choi IS and CS Song. (2010). DNA barcoding techniques for Avian Influenza virus surveillance in migratory bird habitats. *J Wildl Dis.* 46:649-54.
 9. Mulatti P, Fusaro A, Scolamacchia F, Zecchin B, Azzolini A, Zamperin G, Terregino C, Cunial G, Monne I and S Marangon. (2018). Integration of genetic and epidemiological data to infer H5N8 HPAI virus transmission dynamics during the 2016-2017 epidemic in Italy. *Sci. Rep.* 8: 18037.
 10. Pannwitz G, Wolf C and T Harder. (2009). Active surveillance for Avian Influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. *J Wildl Dis.* 45:512-8.
 11. Verhagen JH, Lexmond P, Vuong O, Schutten M, Guldemeester J, Osterhaus ADME, Elbers ARW, Slaterus R, Hornman M, Koch G and RAM Fouchier. (2017). Discordant detection of Avian Influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs. *PLoS One* 12: 1–21.



VACCINAZIONE NEWCASTLE: NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO E PROSPETTIVE FUTURE

Boldini S.¹, Russo E.¹, Fregnani G.², Tosi G.², Beoni M.³, Fiorentini L.², Magrini M.¹, Trevisani G.³, Parigi M.²

¹ *MSD Animal Health Srl, via F.lli Cervi snc Centro Direzionale Milano Due - Palazzo Canova 20090 Segrate (MI) Italy.*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sede Territoriale di Forlì, Via Don E. Servadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC) Italy.*

³ *Eurovo, via Mensa 3, 48022 Santa Maria in Fabriago (RA) Italy.*

Summary

Newcastle disease is an important pathology that causes severe illness and high economic losses in poultry worldwide. Vaccination programs and high biosecurity standards are the only measures to prevent the diffusion of virulent NDV field strains and the disease. In order to control this pathology, many countries established governmental control programs based on vaccination. Today vectored vaccines are commonly used in hatchery because of its efficacy and the simple administration and it is now possible use them in the Italian governmental vaccination program against ND.

This field monitoring analyze the immune-response in three groups of pullets after administration of different vaccination programs (two live and two inactivated vaccines; one rHVT-ND-IBD two live and one inactivated vaccines; one rHVT-ND-IBD one live and one inactivated vaccine), focusing on antibodies titers obtained using three analytical methods: ELISA, HI and VN. Both Elisa and HI showed a similar antibody titers trend in all groups, with a strong increase after the last inactivated vaccine, confirmed by VN.

In order to follow the Italian control plan, this work permitted to obtain data about the role that rHVT-ND-IBD vaccine plays in protection against NDV.

INTRODUZIONE

La malattia di Newcastle (ND) è una patologia del pollame, sostenuta da un Paramixovirus sierotipo 1 (APMV-1), Avulavirus aviario-1 (AvAV-1) secondo la nuova nomenclatura[1]. Patogenicità e sintomatologia clinica sono molto variabili a seconda del ceppo coinvolto. Si distinguono, infatti, cinque patotipi: velogeno viscerotropo, velogeno enterotropo, mesogeno, lentogeno e avirulento [3]. NDV può infettare tutte le specie di avicoli commerciali ed alcune specie di uccelli selvatici con ruolo di reservoir [2,3]. È endemica nel pollame in gran parte del mondo [2,5] e la malattia sostenuta da ceppi velogeni è soggetta a denuncia obbligatoria e inclusa nella lista A dell'Office International des Epizooties (OIE) [4]. In seguito alla grave epidemia di ND del 2000 [6] è stata recepita la direttiva comunitaria 92/66/CEE attraverso il DPR 657/96 e sue successive modifiche, il quale stabilisce il protocollo vaccinale minimo obbligatorio per ogni specie allevata sensibile ad APMV-1 [7] (nota prot. 600.6/24461/25N/118). La profilassi indiretta, associata a efficaci misure di biosicurezza, è, infatti, l'unico mezzo di controllo

effettivo e prevede l'utilizzo di vaccini vivi e vaccini inattivati (rispettivamente ICPI <0,4 e <0,7 dir. 93/152/EEC). Dal 4 giugno 2019 è entrato in vigore il nuovo piano vaccinale secondo il quale, per ovaiole e riproduttori, sono obbligatori due interventi vaccinali con vaccino vivo attenuato (il primo in incubatoio) e uno con vaccino inattivato prima dell'entrata in deposizione. Secondo la normativa, inoltre, è possibile utilizzare anche i vaccini ricombinanti, qualora il nuovo piano vaccinale assicuri per tutta la durata del ciclo produttivo un'immunità superiore o uguale a quella indotta dal piano vaccinale suggerito dal ministero, che prevede solo l'utilizzo di vaccini tradizionali.

I test sierologici sono lo strumento più semplice per valutare l'efficacia della vaccinazione, i più utilizzati in diagnostica di routine sono: l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI), utilizzata ufficialmente per la valutazione del titolo anticorpale medio, e i Kit commerciali ELISA [9], che possono essere costruiti al fine di evidenziare la risposta ad un ceppo di campo o ai vaccini, anche vettorizzati (IDvet, BioChek)[10].

La continua evoluzione dell'industria avicola, degli aspetti sanitari ad essa correlati e l'innovazione in campo vaccinale, hanno creato la necessità di una rivalutazione degli aspetti normativi che disciplinano il controllo della malattia sul territorio italiano. Lo scopo del presente monitoraggio è ottenere dati sierologici con differenti metodiche, che possano fornire un supporto nella pianificazione mirata degli interventi vaccinali ND in fase pollastra.

MATERIALI E METODI

Animali e piani vaccinali

Tre gruppi di pollastre figlie dello stesso gruppo di riproduttori e schiuse nell'arco di una settimana dal medesimo incubatoio, sono stati vaccinati secondo tre diversi piani vaccinali e accasati a terra in tre diversi capannoni del medesimo allevamento:

- Gruppo 1A: vaccinazione tradizionale con un vaccino vivo attenuato somministrato spray al giorno 1 in incubatoio, un vaccino vivo attenuato somministrato a 18 giorni in acqua di bevanda; due vaccini spenti somministrati a 39 e 88 giorni intramuscolo.
- Gruppo 2B: rHVT-ND-IBD via sottocute e un vaccino vivo attenuato somministrato spray in incubatoio al giorno 1, un vaccino vivo attenuato al giorno 15 in acqua di bevanda; uno spento somministrato a 88 giorni intramuscolo.
- Gruppo 3C: rHVT-ND-IBD via sottocute, un vaccino vivo attenuato somministrato spray in incubatoio al giorno 1 e un vaccino spento somministrato al giorno 88 intramuscolo.

Gli animali sono stati monitorati clinicamente durante tutta la durata della prova e non è stata riscontrata mortalità anomala, sintomatologia clinica e/o reazioni vaccinali.

Campionamento e indagini sierologiche

I campioni sierologici effettuati nell'ambito delle normali procedure di monitoraggio di routine prevedevano il prelievo di 20 campioni di sangue per capannone a 1, 11, 18, 25, 39, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 107, 114, 122, 128 giorni di età.

Alle normali analisi sierologiche di routine, che prevedono la quantificazione degli

anticorpi per malattia di Newcastle mediante Inibizione dell'emoagglutinazione (HI), sono state aggiunte le quantificazioni degli anticorpi per malattia di Newcastle mediante ELISA con kit ID Screen®Newcastle Disease Indirect ID Vet, e, nei campioni effettuati da 60 giorni in poi, mediante Virus Neutralizzazione (VN). Tutte le analisi sono state eseguite presso l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna, sede territoriale di Forlì.

RISULTATI

I tre gruppi hanno mostrato un andamento simile dei titoli anticorpali. In seguito alla seconda somministrazione di vaccino vivo attenuato a 18 giorni nei gruppi 1A e 2B, i titoli anticorpali hanno subito un calo sovrapponibile a quello del gruppo 3C che non ha ricevuto il vaccino (Figura 1 e 2). Il gruppo 1A, l'unico ad aver ricevuto il primo vaccino spento a 39 giorni, ha presentato un picco più alto a 60 giorni rispetto ai gruppi 2B e 3C (Figura 1 e 2).

Dopo la somministrazione del vaccino spento a 88 giorni, i gruppi hanno mostrato una analoga risposta al vaccino con valori sovrapponibili (Figure 1, 2 e 3).

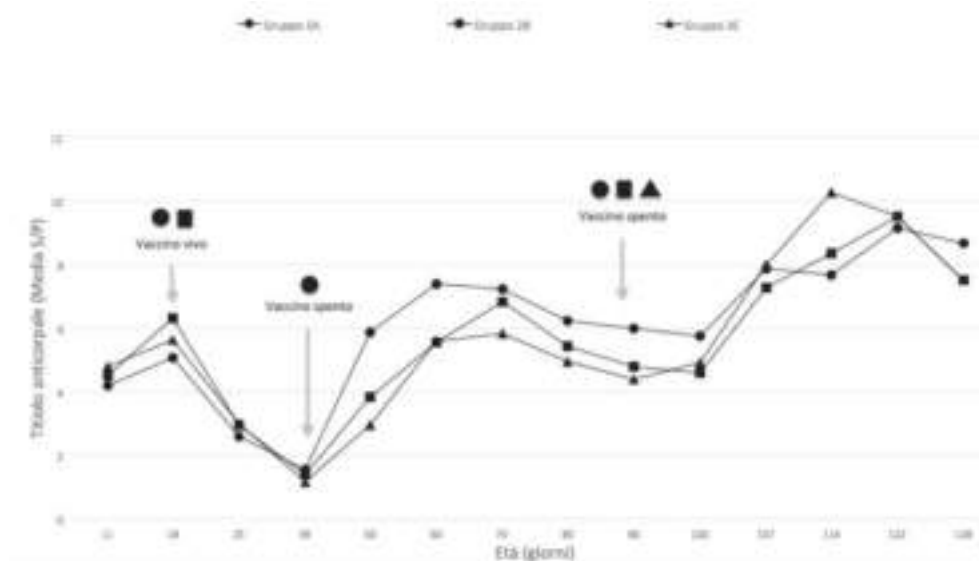


Figura 1. Media dei titoli anticorpali ottenuti con metodica ELISA nei tre gruppi. I simboli indicano il giorno di vaccinazione e corrispondono al gruppo al quale è stato somministrato il vaccino. Il limite di positività di questo test è pari a 0,3

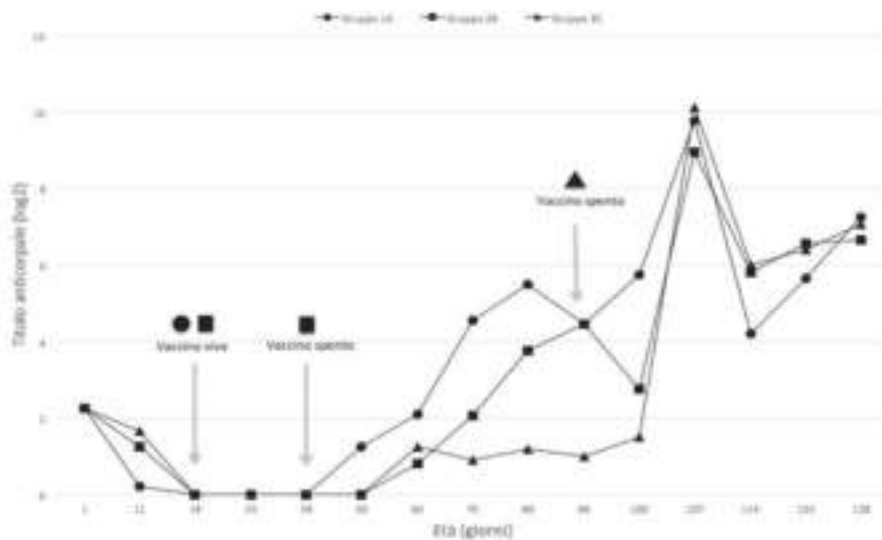


Figura 2. Valore medio del log2 del titolo anticorpale ottenuto mediante HI nei tre gruppi. I simboli indicano il giorno di vaccinazione e corrispondono al gruppo al quale è stato somministrato il vaccino. I valori al di sotto del limite di positività (1:8) non sono stati testati e sono stati considerati soltanto negativi, ai fini grafici gli è stato attribuito valore pari a zero.

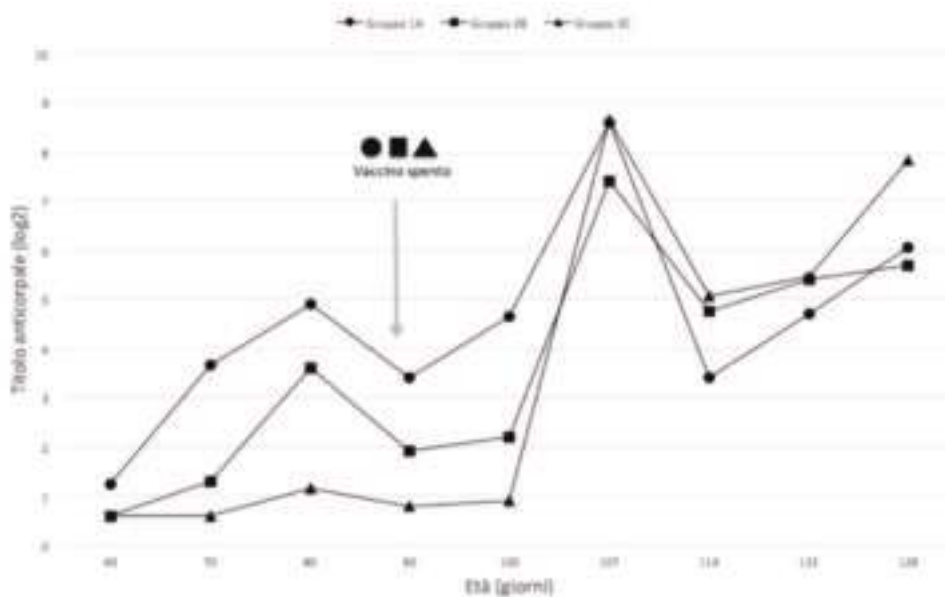


Figura 3. Titolo anticorpale ottenuto con VN nei tre gruppi dal giorno 60 in poi. I simboli indicano il giorno di vaccinazione e corrispondono al gruppo al quale è stato somministrato il vaccino.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi dei dati ottenuti da questo monitoraggio ha permesso di valutare l'andamento dei titoli anticorpali per la malattia di Newcastle in seguito a diversi piani vaccinali su pollastre allevate in campo. Alla luce dei risultati ottenuti in tre gruppi oggetto di studio hanno mostrato un andamento simile del titolo, come dimostrato dalla sierologia mediante ELISA e HI in cui le curve ottenute sono sovrapponibili. Dopo il vivo attenuato somministrato al giorno 18 si è rilevata, con entrambe le metodiche utilizzate in questa fase del monitoraggio, un calo dei titoli in tutti i gruppi. La caduta dei titoli rilevati con HI al di sotto del limite di positività è in accordo con quanto riscontrato in un precedente studio[8].

In seguito alla somministrazione del vaccino inattivato a 88 giorni, si è rilevato un incremento di titoli anticorpali che con tutte le metodiche è risultato sovrapponibile in tutti e tre i gruppi. Questo risultato suggerisce che il vaccino rHVT-ND-IBD associato ad un vivo attenuato via spray in incubatoio e ad uno inattivato prima dell'entrata in deposizione possa fornire alla gallina ovaioia in produzione un livello di protezione analogo al piano vaccinale tradizionale. La riduzione ad un solo intervento con vaccino inattivato, inoltre, è oggi sostenuta dal punto di vista normativo, considerate le recenti modifiche al piano di controllo nazionale, e comporta numerosi vantaggi in termini economici, di biosicurezza e di riduzione dello stress dell'animale.

BIBLIOGRAFIA

1. Amarasinghe GK, Bao Y, Basler CF, Bavari S, Beer M, Bejerman N, Blasdel KR, Bochnowski A, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Chandran K, Collins PL, Dietzgen RG, Dolnik O, Durrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Fang Q, Formenty P, Fouchier RAM, Ghedin E, Harding RM, Hewson R, Higgins CM, Hong J, Horie M, James AP, Jiang D et al. (2017). Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2017. *Arch Virol* 162:2493–2504.
2. Vienna R, Brown, Sarah N, Bevins. (2017). A review of virulent Newcastle disease viruses in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. *Veterinary Research* 2017,48:68.
3. DJ Alexander. (2000). Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000,19 (2),443-462.
4. Terrestrial Manual OIE. (2018). Newcastle Disease, chapter3.3.14.
5. K.M. Dimitrov, A.M. Ramey, X. Qiu, J. Bahl, C.L. Afonso (2016) Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus) *Infect. Genet. Evol.*, 39 (2016), pp.22-34.
6. Capua I., Dalla Pozza M., Marangon S., Mutinelli F., Terregino C. (2002). Newcastle disease outbreaks in Italy. *The Vet Rec* 150 (18):565-568.
7. Communities, C.o.t.E. (1992). Council directive 92/66/EEC of 14 July 1992 introducing community measures for the control of Newcastle disease. *Offic. J. Eur. Communities* L260, 1–20.
8. Tamba M., Tosi G., Massi P., Bacchicocchi F. (2001). Valutazione dell'efficacia nel broiler di diversi piani vaccinali contro la malattia di Newcastle. *Large An. Review*, 7(6),89-90.

9. Patti J. Miller, Guus Koch. (2013). Newcastle Disease. Diseases of Poultry, Thirteenth Edition. David E. Swayne. 2013 John Wiley & Sons, Inc. Published 2013 by John Wiley & Sons, Inc.
10. G. Slacuma, B. Leerdamb , B. Damb. (2012). The use of ELISA (Biochek) to detect antibodies following vaccination with different recombinant HVT vectored vaccines for NDV, ILTV, and IBDV. Proceedings Of The Sixty-First Western Poultry Disease Conference April 2-4, 2012 Scottsdale, AZ

LA DIETA A BASE DI *HERMETIA ILLUCENS* MODULA IL MICROBIOTA INTESTINALE, LA PRODUZIONE DI SCFA E LA SAZIETÀ VIA GLP-1 NELLE GALLINE OVAIOLE

Borrelli L.^{1,5}, Dipineto L.^{1,5}, Aceto S.^{2,5}, Coretti L.^{3,4,5}, Bovera F.¹, Valoroso M. C.², Pace A.¹, Varriale L.¹, Russo T. P.¹, Santaniello A.¹, Menna L. F.¹, Fioretti A.^{1,5}

¹ *Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, Via Delpino 1 Napoli, Italia*

² *Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia*

³ *Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Medicine and Surgery, University of Malta, Msida, Malta*

⁴ *Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia*

⁵ *Task Force on Microbiome Studies, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia*

Summary

Insects represent a potential nutritional sources both for humans and animals. *Hermetia illucens*, with good amount of chitin and proteins, could be a suitable diet replacement for laying hens. In this study we investigated the effect of *H. illucens* larvae meal administration on cecal microbiota, short chain fatty acids (SCFAs) production, feed intake and GLP-1 gene expression in laying hens.

INTRODUZIONE

Lo sviluppo di prodotti alimentari commerciabili a base di insetti potrebbe essere una fonte efficiente e sicura di sostanze nutritive, oggi soprattutto per motivi di sostenibilità ambientale considerando l'impatto della produzione alimentare sui cambiamenti climatici. Circa 1.900 specie commestibili sono consumate in alimentazione umana e animale (Van Huis et al. 2013; Borrelli et al., 2017) e in tutto il mondo, gli insetti vengono consumati a causa della loro ricchezza in proteine, grassi, vitamine, minerali e fibre. Tra questi *Hermetia Illucens*, un dittero della famiglia Stratiomyidae, conosciuta come black soldier fly ("mosca soldato nera") rappresenta una valida alternativa. Sostanze come la chitina, uno dei principali biopolimeri presenti in natura, altamente contenuta nella farina di insetti, possono essere un substrato perfetto per la fermentazione batterica e per la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) che promuovono sia la salute dell'intestino che la salute in generale. Gli SCFAs e in particolare l'acido acetico, butirrico e propionico, una volta assorbiti sistematicamente per via ematica, giocano un ruolo essenziale come bioregolatori e promotori della crescita della mucosa intestinale influenzando a loro volta il metabolismo. Negli ultimi anni sta crescendo sempre di più l'interesse verso la modulazione degli SCFAs attraverso la dieta. Sempre più evidenze confermano che una dieta arricchita con specifici carboidrati non digeribili porta ad una maggiore produzione intestinale di SCFA e riduce l'aumento di peso corporeo, la massa grassa e induce variazioni nel comportamento alimentare, legate alla modulazione della produzione e secrezione di peptidi intestinali. Questo fattore è ampiamente discusso dalla comunità scientifica per intervenire sulla riduzione dell'obesità. IL GLP-1 è un ormone polipeptidico appartenente alla famiglia degli enteroglucagoni, che viene secreto dalle cellule L

dell'intestino distale. Esso è presente anche in numerose zone dell'encefalo come il Nucleo paraventricolare e dorso mediale dell'ipotalamo, il talamo e l'ipofisi, ove funziona da neurotrasmettitore. GLP-1 riduce l'assunzione di cibo e infatti in obesità risulta ridotto. Nei polli l'mRNA del recettore GLP-1 è largamente distribuito nel tratto gastrointestinale e nell'encefalo. Prove recenti suggeriscono che GLP-1 svolge un'azione anoressigenica nei pulcini e può avere un ruolo importante nella regolazione dell'assunzione di cibo. Come dimostrato da alcuni studi precedenti, la dieta a base di larve di *Hermetia Illucens* ha avuto diversi effetti positivi sulla morfometria e sull'attività enzimatica dell'intestino tenue, nonché buoni effetti sulla salute delle galline ovaiole, riducendo i livelli di colesterolo e trigliceridi nel siero e nelle uova. Considerando anche il crescente interesse verso il ruolo degli SCFAs quali principali metaboliti batterici, lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare attraverso analisi metagenomica, analisi gascromatografica e l'analisi dell'espressione di alcuni geni coinvolti nell'asse microbiota-intestino-cervello, gli effetti della supplementazione di tale dieta in galline ovaiole.

MATERIALI E METODI

Due gruppi di galline ovaiole old Lohman Brown Classic di 24 settimane di età sono stati analizzati: un gruppo di 12 galline alimentate con una dieta a base di farine di insetto contenente larve di *Hermetia Illucens* (ID) e un gruppo controllo di 12 galline alimentate con dieta a base di farina di mais-soia (SD). Tutti gli animali sono stati trattati consapevolmente secondo la Direttiva 2010/63/UE, protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Dopo 21 settimane le galline sono state sottoposte ad eutanasia mediante dislocazione cervicale e sottoposte ad esame necroscopico durante il quale venivano rimossi, operando in sterilità, i ciechi da ciascuna gallina. Da uno dei due ciechi è stato estratto tutto il DNA batterico. Le regioni V3-V4 del 16SrDNA sono state amplificate a partire da 200ng di DNA. L'analisi metagenomica sui dati risultanti è stata condotta come riportato da Borrelli et al. (2017). Dall'altro cieco sono stati analizzati i livelli di SCFA, mediante gascromatografia. L'assunzione di mangime (feed intake) è stata misurata pesando la quantità di mangime distribuita, quella di mangime residuo e disperso ed è stata espressa come assunzione individuale di mangime per giorno (grammi / giorno / gallina). Infine, il cervello è stato rimosso per valutare l'espressione dell'mRNA di GLP-1 utilizzando RT-qPCR come descritto da Borrelli et al. (2016).

RISULTATI

Il tipo e l'abbondanza relativa delle specie microbiche del cieco hanno mostrato forti differenze tra i gruppi SD e ID. *Alkaliphilus transvaalensis*, *Christensenella minuta* e *Flavonifractor plautii* rappresentano i principali contributori ($p < 0,05$) di questo cambiamento e hanno mostrato avere il potenziale di degradare la chitina della farina di insetto e inoltre risultano essere correlati agli alti livelli osservati di SCFA intestinali, in particolare butirrato e propionato, nel gruppo ID ($p < 0.001$). Questo gruppo ha anche mostrato una riduzione statisticamente significativa dell'assunzione di alimento e una maggiore espressione di GLP-1 a livello centrale ($p < 0,05$).

DISCUSSIONE

Hermetia illucens può essere considerato un potenziale prebiotico, in quanto "ali-

menta” bene il microbiota intestinale nelle galline ovaiole. In particolare, la produzione di SCFAs, derivati dalla fermentazione della chitina da parte di particolari batteri contenuta nella farina a base di larve di *H. illucens*, può influenzare direttamente la neurochimica del cervello aumentando l’espressione del gene GLP-1 del cervello e riducendo il comportamento di assunzione di mangime. Nel presente studio, l’aumento di SCFA, che agiscono attraverso i recettori GPR41 e GPR43 a livello delle cellule L, stimolerebbe la produzione e la secrezione dell’ormone della sazietà, GLP-1 e la conseguente riduzione di assunzione di cibo nel gruppo ID. Questo risultato in accordo con altri studi evidenzia la possibilità che gli aumenti del butirrato circolante possano influenzare direttamente la funzione del SNC. È necessario valutare la dieta e il cibo a base di insetti sia per l’alimentazione animale che umana considerando il crescente interesse mondiale e il potenziale contributo che può avere agendo non solo nella produzione energetica ma anche sull’asse microbiota-intestino-cervello, sia nell’eziologia che nel trattamento di numerosi disturbi metabolici.

CONCLUSIONI

I cambiamenti nel microbiota intestinale, a seguito dell’alimentazione con farina di larve di insetti, sono nuovi e altamente significativi nel nostro studio. Qui il microbiota svolge un ruolo chiave nel coordinamento della degradazione dei polisaccaridi come la chitina, responsabile dell’aumento delle concentrazioni di SCFA, come mediatori microbici chiave nell’asse intestino-cervello, aumentando la sazietà e promuovendo sia l’intestino che la salute generale.

Gli insetti possono sostituire parzialmente gli ingredienti proteici nell’industria zootecnica e avicola. Per questo motivo l’obiettivo per il 2020 è introdurre gli insetti d’allevamento come ingredienti per mangimi e alimenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F, Chiariotti L, Nizza A, Lembo F, Fioretti A, 2017. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Sci Rep.* 24;7(1):16269. doi: 10.1038/s41598-017-16560-6
2. S. Marono, R. Loponte, P. Lombardi, G. Vassalotti, M. E. Pero, F. Russo, L. Gasco, G. Parisi, G. Piccolo, S. Nizza, C. Di Meo, Y. A. Attia, F. Bovera, Productive performance and blood profiles of laying hens fed *Hermetia illucens* larvae meal as total replacement of soybean meal from 24 to 45 weeks of age, *Poultry Science*, Volume 96, Issue 6, 1783–1790, doi: 10.3382/ps/pew461
3. Honda K. Glucagon-related peptides and the regulation of food intake in chickens. *Anim Sci J.* 2016;87:1090–8.
4. Borrelli L, Aceto S, Agnisola C, De Paolo S, Dipineto L, Stilling RM, Dinan, TG, Cryan JF, Menna LF, Fioretti A, 2016. Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish *Sci Rep.* 15;6:30046. doi: 10.1038/srep30046



AGGIORNAMENTI SULLA VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE IN CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ISOLATI NEL SETTORE AVICOLO

Bottinelli M., Fincato A., Picchi M., Alessandri G., Ceoletta A., Paladino A., Catania S.

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

Summary

Mycoplasma synoviae (MS) is one of the most important *Mycoplasma* species in poultry. This bacterium is responsible of chronic disease and severe economic losses. One of the control strategies that can be applied to contain this highly prevalent pathogen is the antibiotic treatment of infected animals. It is, then, very important for veterinarians to know the antibiotic susceptibility of the circulating strains in order to choose the most appropriate antibiotic molecule. The aim of this work was to evaluate the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of enrofloxacin, oxytetracycline, doxycycline, erythromycin, tylosin, tilmicosin, spiramycin, tiamulin, florfenicol and lincomycin for Italian MS isolates. All MS isolates showed high MIC values of erythromycin and enrofloxacin, while were sensible to tetracyclines. Macrolides were effective in inhibiting MS growth, even though some isolates showed high MIC values of tilmicosin. Seven isolates showed high MIC values of lincomycin, tilmicosin and spiramycin. Since we noted differences between our results and data present in literature, future studies on MIC values of the most used drugs for MS are needed in order to support veterinarians in selecting the proper antibiotic treatment.

INTRODUZIONE

Mycoplasma synoviae (MS) è considerata una delle specie di *Mycoplasma* più importanti per il settore avicolo. Infatti, quest'organismo patogeno determina una malattia cronica negli animali e comporta, conseguentemente, ingenti perdite economiche. Il controllo di questa patologia si basa su strette misure di biosicurezza, protocolli vaccinali (ove disponibili) e specifici programmi di eradicazione nei gruppi di riproduttori a causa dell'abilità di MS di essere trasmesso verticalmente [1]. Nonostante l'applicazione di queste strategie di controllo, la prevalenza di MS resta alta nella popolazione avicola evidenziando l'assenza di un importante tassello gestionale/epidemiologico. Siccome il trattamento antibiotico degli animali può solo mitigare i segni clinici della malattia senza eradicare l'infezione [2], è evidente l'importanza di conoscere la sensibilità agli antibiotici dei ceppi di MS circolanti sul territorio. Infatti, in questo modo si può massimizzare l'efficacia del trattamento e ridurre la pressione selettiva sul microrganismo, evitando di promuovere lo sviluppo di antibiotico-resistenza. Data l'assenza di dati recenti riguardanti la sensibilità di MS agli antibiotici, l'obiettivo del presente lavoro è stato di valutare i valori di Concentrazione Minima Inibente (MIC) di oltre 150 ceppi italiani di MS provenienti da diverse categorie commerciali (pollo broiler, gallina ovaiole e tacchino).

MATERIALI E METODI

Selezione dei ceppi di Mycoplasma synoviae

I ceppi di MS sono stati selezionati dalla collezione dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie sulla base dei seguenti criteri: anno d'isolamento, specie aviare, settore avicolo e genotipo. La selezione è avvenuta con lo scopo ultimo di rappresentare, per quanto possibile, la situazione epidemiologica di campo. Ogni isolato appartiene a un singolo focolaio di malattia.

Coltivazione in vitro dei ceppi

I ceppi sono derivati da attività di campo o necroscopica, in seguito alla raccolta di tamponi tracheali in animali con sintomatologia ascrivibile a MS. I tamponi sono stati rapidamente inoculati nel terreno di trasporto Mycoplasma Experience® (ME, Reigate, UK) e conferiti presso il laboratorio per la coltivazione di *Mycoplasma* spp. seguendo la nostra procedura interna.

Identificazione di Mycoplasma synoviae e analisi vlhA

L'analisi del gene *vlhA* è stata effettuata per escludere la presenza di ceppi vaccinali e per selezionare i ceppi sulla base della prevalenza italiana. Per identificare la specie di *Mycoplasma*, un'aliquota di 300 µL da brodi sospetti positivi è stata sottoposta ad estrazione del DNA, e il DNA ottenuto è stato testato con 16S rRNA PCR e Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

Valutazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC)

La procedura MIC è stata effettuata tramite microdiluizione in brodo seguendo la nostra procedura interna, la quale si basa sulle linee guida di Hannan con alcune modifiche [3] e la procedura standardizzata per i micoplasmi umani [4]. Sono state utilizzate piastre MIC commerciali da 96 pozzetti contenenti antibiotici liofilizzati (Merlin Diagnostik®). Gli antibiotici inclusi nelle piastre MIC sono: enrofloxacin, ossitetraciclina, doxyciclina, eritromicina, tilosina, tilmicosina, spiramicina, tiamulina, florfenicolo e lincomicina. Dopo l'inoculo batterico, le piastre sono state incubate a 37±1°C e controllate entro 24-48 ore. Ogni ceppo è stato testato in duplicato e considerato valido quando entrambe le piastre MIC producevano risultati identici.

RISULTATI

Sono stati ottenuti valori di MIC elevati per enrofloxacin ed eritromicina. I valori di MIC di doxyciclina e ossitetraciclina ottenuti sono sovrapponibili e differiscono di una sola diluizione. A differenza della tilosina e delle altre molecole, che hanno mostrato una distribuzione unimodale dei valori di MIC, la tilmicosina ha mostrato una distribuzione bimodale con 26 ceppi aventi MIC ≥32 µg/mL. Inoltre, 7 ceppi hanno mostrato alti valori di MIC per tilmicosina, lincomicina e spiramicina. Tutti i ceppi hanno mostrato valori di MIC ≤4 µg/mL per il florfenicolo.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dal nostro studio sono coerenti con i dati italiani precedenti, mentre mostrano differenze rispetto a quelli riportati in altri lavori esteri [5,6,7,8,9,10]. Infatti, sono stati riscontrati valori elevati di MIC per enrofloxacin nonostante questa

sia considerata una tra le molecole d'elezione per il trattamento delle micoplasmosi. I ceppi testati hanno mostrato una buona sensibilità nei confronti delle tetracicline e un'elevata resistenza all'eritromicina, dato atteso per questa molecola. I valori di MIC per i macrolidi denotano una buona efficacia di questa classe di antibiotici, con la tilosina che può considerarsi uno dei farmaci d'elezione; tuttavia, è stata rilevata la presenza di isolati con valori di MIC elevati per la tilmicosina. È bene segnalare che, nonostante il possibile utilizzo di tali molecole nel settore avicolo, resta da comprendere la causa di tale apparente discrepanza. La maggior parte dei ceppi si è dimostrata sensibile alla spiramicina, alla tiamulina e al florfenicolo, seppur alcuni ceppi abbiano mostrato alti valori di MIC per lincomicina, tilmicosina e spiramicina.

CONCLUSIONI

Continuare a studiare l'andamento dei valori di MIC di questo *Mycoplasma* impattante per il settore avicolo, insieme al consolidamento del dato pregresso, risulterà di fondamentale importanza per supportare i veterinari nella selezione del farmaco ed evitare lo sviluppo di antibiotico-resistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Swayne DE, Glisson JR. (2013). Diseases of Poultry. – 13th ed.
2. Kleven SH. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 52: 367-374.
3. Hannan PCT. (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet Res.* 31: 373-395.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas: approved guideline. *CLSI document.* M43-A Vol. 31 No. 19. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m43/>
5. Lysnyansky I, Gerchman I, Flaminio B, Catania S. (2015) Decreased susceptibility to macrolide-lincosamide in *Mycoplasma synoviae* is associated with mutations in 23S ribosomal RNA. *Microb. Drug. Resist.* 21(6): 581-589.
6. Hannan PCT, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N, Stegemann H. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents. Ch.* 1997;41: 2037-2040.
7. Dufour-Gesbert F, Dheilley A, Marois C, Kempf I. (2006). Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet. Microbiol.* 114: 148-154.
8. Landman WJM, Mevius DJ, Veldman KT, Feberwee A. (2008). *In vitro* antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory tract of commercial poultry. *Avian Pathol.* 37(4): 415-420.
9. Kreizinger Z, Gróznér D, Sulyok KM, Nilsson K, Hrivnák V, Benčina D, et al. (2017). Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe. *BMC Vet. Research.* 13: 342.



CONFERMA SPERIMENTALE DELLA TRASMISSIONE VETTORIALE DELLA TIFOSI AVIARE MEDIATA DA *DERMANYSSUS GALLINAE*

Cocciolo G.¹, Circella E.¹, Pugliese N.¹, Lupini C.², Mescolini G.², Zoller H.³, Borchert-Stuhlträger M.³, Thomas E.³, Catelli E.², Camarda A.¹

¹ *Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Italy*

² *Department of Veterinary Medical Science, University of Bologna, Italy*

³ *MSD Animal Health Innovation GmbH, Germany*

Summary

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1778) is a major ectoparasite of poultry, widely diffused all over the world. Beside this direct effect on the animal welfare, it is well known for being associated with many pathogens, including *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum, the aetiological agent of the fowl typhoid. The association between *D. gallinae* and *Salmonella* Gallinarum has been already demonstrated under laboratory condition (Zeman et al., 1982) and in field (Pugliese et al., 2018), but the current data are not enough to demonstrate the role of the mite as a vector of fowl typhoid. Therefore, the aim of this study was the assessment of the vectorial role of *D. gallinae* in controlled condition of infection and infestation.

Specifically, four groups of laying hens, each consisting of eight individuals, were located in as many isolators. Two groups were artificially infected by gavage with *S. Gallinarum* (6x10⁸ CFU/ml) and, seven days after, they were infested with about 25,000 mites. Mites were collected 72 hours after infestation, starved and then used to infest hens of the other two groups.

The clinical signs, the mite contamination, the *S. Gallinarum* colonization of in hens' organs were evaluated and recorded during the entire investigation. The gathered data were used to calculate the infection rate and the vectorial capacity of *D. gallinae* to transmit *S. Gallinarum*.

Results showed that the mites became infected 24 hours after the infection of the hens and that, following infestation, the healthy chickens were affected by fowl typhoid. *S. Gallinarum* was detected in the organs of animals from the infested groups to confirm the origin of the disease.

On aggregate, all data proved that *D. gallinae* act as a vector of fowl typhoid as it transmits *S. Gallinarum* from infected to healthy laying hens, in a very effective way.

INTRODUZIONE

L'acaro rosso del pollame *Dermanyssus (D.) gallinae* è un ectoparassita molto diffuso negli allevamenti avicoli a vita produttiva lunga [1]. Oltre ai ben documentati effetti negativi sugli animali allevati [2], si suppone che *D. gallinae* possa giocare un ruolo nella trasmissione di numerosi agenti patogeni [3]. Tra questi, uno dei più pericolosi per l'allevamento avicolo è *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) ser. Gallinarum, microrganismo responsabile della tifosi aviare [3]. L'associazione tra *D. gallinae* e *S. Gallinarum* è stata verificata già negli anni '80 [4]; più recentemente, è stato osservato che in campo esiste

una stretta relazione tra circolazione del patogeno nell'allevamento, severità dell'infestazione e carica patogena nell'acaro [5]. Tuttavia, nonostante i numerosi indizi, non è ancora stata prodotta la prova definitiva della trasmissione del patogeno e/o della malattia mediata da *D. gallinae*.

Pertanto, il presente studio è stato mirato ad ottenere tale prova ricostruendo in idonei isolatori i passaggi di infezione, infestazione e trasmissione necessari per stabilire il ruolo vettoriale dell'acaro nei confronti di *S. Gallinarum*.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Trentadue galline ovaiole SPF Hy-Lyne® Brown di 10 mesi di età sono state divise in quattro gruppi e collocate in altrettanti isolatori. Ogni animale era riconoscibile da un codice univoco stampigliato su un anello apposto alla zampa sinistra. Le galline negli isolatori A e B sono state infettate (D1) mediante somministrazione orale di 6×10^7 CFU di un ceppo patogeno di *S. Gallinarum*.

Dopo 7 giorni (D8), sono stati introdotti circa 25.000 acari rossi del pollame in ognuno dei due isolatori A e B. Dopo due giorni gli acari sono stati rimossi mediante delle trappole in legno, tenuti in starvation per 24 h e reintrodotti negli isolatori C e D (D11). Le galline sopravvissute dei gruppi A e B sono state sottoposte a eutanasia contestualmente alla rimozione degli acari, mentre le altre sono state tenute in osservazione per altri 24 giorni dopo l'infestazione.

Lo stato di salute di tutte le galline è stato monitorato due volte al giorno e classificato secondo uno *score* clinico (*clinical score*) allestito sulla base degli indicatori elencati in Tab. 1. Ciascun soggetto è stato considerato ammalato quando il *clinical score* giornaliero era superiore a 4.

A periodi prestabiliti sono stati inoltre raccolti dei campioni di feci, da cui è stata effettuata la ricerca di *S. Gallinarum* mediante seminested PCR (snPCR) e indagine colturale [8].

Tabella 1. Criteri per l'assegnazione del punteggio clinico sulla base dello stato di salute delle galline.

Segni clinici osservati	Punteggio
Comportamento normale, assenza di segni di malattia	1
Diarrea	2
Abbattimento del sensorio	4
Abbattimento del sensorio e diarrea	5
Letargia	6
Letargia e diarrea	7
Morte	40

Campionamento e analisi degli acari

A D9 e D11 sono state raccolte aliquote da 100 acari ciascuna dagli isolatori A e B.

A D10, altre due aliquote sono state ottenute dalle trappole prelevate dagli stessi isolatori. A D36, alla fine della sperimentazione, sono stati raccolti gli acari che erano rimasti negli isolatori A e B e il maggior numero possibile di acari presenti negli isolatori C e D. In tutti i casi sono state preparate delle aliquote da 100 acari ciascuna.

Alcune delle aliquote ottenute dagli isolatori C e D a D36 sono state lavate con formalina.

Da tutte le aliquote ottenute è stato estratto il DNA mediante kit commerciali (Thermo Scientific, Milano, Italia). Questo è stato utilizzato per la ricerca e quantificazione di *S. Gallinarum* rispettivamente mediante seminested PCR (snPCR) [6] e real-time PCR (qPCR) [5].

Esame necroscopico e studio degli organi

L'esame necroscopico è stato effettuato per tutte le galline, decedute spontaneamente o sottoposte ad eutanasia. Dopo la necropsia sono stati prelevati gli organi bersaglio, nello specifico fegato, milza, ovario e ceco. A partire da 30 mg di tessuto è stata effettuata l'estrazione di DNA utilizzando kit commerciali (Thermo Scientific) per accertare l'infezione da *S. Gallinarum* mediante snPCR [6].

Analisi statistica

Preliminarmente, è stata verificata la distribuzione normale dei dati numerici ottenuti, relativamente alla carica di *S. Gallinarum* rilevata negli acari, mediante il test di Shapiro-Wilk. Rilevata la loro non normalità, sono stati adottati test non parametrici per lo studio e il confronto di tali dataset. I dati categorici (numero degli animali ammalati o deceduti, organi positivi a *S. Gallinarum*) sono stati confrontati mediante il test esatto di Fisher. Tutte le analisi statistiche sono state condotte in R v. 3.6.1.

Inoltre, è stato stimato il tasso d'infezione (IR) attraverso l'add-in di Microsoft Excel® PooledInfRate, messo a punto dal Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [7], il tasso d'infezione entomologico (EIR) che mette in relazione IR e numero di artropodi che entrano in contatto con un ospite [8], e la capacità vettoriale, che quantifica la probabilità che un artropode possa trasmettere un patogeno dopo il contatto con un ospite infetto [9, 10].

Autorizzazione

La sperimentazione è stata autorizzata dal Ministero della Salute (aut. n. 718/2017-PR del 2 ottobre 2017). Tutte le operazioni sono state condotte nel pieno rispetto della normativa europea sul benessere animale n. 2010/63/EU.

RISULTATI

Insorgenza della tifosi aviare

Quindici galline ovaiole sulle sedici appartenenti ai gruppi A e B hanno mostrato segni di tifosi aviare e 6 ne sono morte, e 13, di cui 11 sono decedute, si sono ammalate nei gruppi C e D.

La Tab.2 riepiloga incidenza e mortalità osservate.

Tabella 2. Incidenza e mortalità osservate nei gruppi sperimentali.

Gruppo	Ammalate	Decedute
A	8	1
B	7	5
A+B	15	6
C	7	7
D	6	4
C+D	13	11

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata in termini di animali ammalati ($P = 0.600$) o deceduti ($P = 0.181$).

L'esame necroscopico ha confermato il sospetto di tifosi aviare in tutti i gruppi che presentavano le tipiche lesioni, tra cui, decolorazione della cresta e dei bargigli, imbrattamento cloacale da diarrea, congestione ed ipertrofia di fegato e milza, che presentavano focolai necrotici in superficie. In alcuni casi si osservavano ovarite necrotica e congestione del rene.

A conferma della diagnosi, *S. Gallinarum* è stata identificata da almeno un organo di tutti i 32 animali inclusi nella sperimentazione.

Invece, non è stato rilevato il patogeno dai tamponi cloacali.

Relazione tra Dermanyssus gallinae e Salmonella enterica subsp. enterica ser. Gallinarum

Tutte le aliquote di acari saggiate, eccetto una, sono risultate positive per *S. Gallinarum*. Su queste è stato calcolato un IR pari a 27.93 acari infetti per mille, un EIR di 25.14 contatti infetti per mille, ed una capacità vettoriale di 467.42.

La carica media degli acari raccolti dagli isolatori A e B nei tre giorni successivi l'infestazione è stata di 16.71 cellule di *S. Gallinarum* per acaro, e di 168.69 cellule per acari nei gruppi prelevati dagli isolatori C e D al termine della sperimentazione (D36). La differenza, tuttavia, non era pienamente significativa, anche se il dato cade nel limite di significatività ($P = 0.073$).

Il patogeno è stato rilevato anche da tutte le aliquote lavate con formalina, e in questo caso la media è stata di 133.69 cellule di *S. Gallinarum* per acaro, senza differenze significative rispetto alla carica delle aliquote non lavate ($P = 0.211$).

DISCUSSIONE

Nel complesso, i dati indicano che *D. gallinae* è stato in grado di trasmettere *S. Gallinarum* dalle galline infette a quelle sane. Infatti, poiché tutti gli animali sono stati alloggiati in isolatori durante l'intero svolgimento della sperimentazione, l'unico punto di contatto tra i gruppi infetti (A e B) e i gruppi infestati (C e D) sono stati gli acari. Inoltre, considerato che la maggior parte degli animali di questi ultimi due gruppi hanno anche manifestato la malattia, è evidente che *D. gallinae* è in grado di introdurre nell'ospite sano una quantità di patogeno sufficiente a sviluppare la malattia.

I dati fanno inoltre supporre che, molto probabilmente, gli acari si sono infettati

attraverso il pasto di sangue, poiché le deiezioni delle galline ovaiole erano poco accessibili e, in ogni caso, l'eliminazione di *S. Gallinarum* era assente (o perlomeno ridotta) vista la negatività dei campioni di feci. Questo spiegherebbe anche la contaminazione interna degli acari, evidenziata dall'identificazione del patogeno anche dalle aliquote lavate con formalina.

Resta però il dubbio sull'effettiva modalità di trasmissione agli animali. Infatti, *D. gallinae* potrebbe veicolare *S. Gallinarum* mordendo l'ospite per effettuare il pasto di sangue, o venendo ingerito dalle galline che si beccano per il fastidio dell'infestazione. Per chiarire il processo di trasmissione saranno necessari studi mirati.

Nonostante questa incognita, l'acaro rosso del pollame ha tutti i requisiti per essere un importante vettore della tifoosi aviare. In particolare, è da sottolineare il notevole valore della capacità vettoriale, legato all'alto tasso di sopravvivenza di *D. gallinae* e all'elevata proporzione di acari che può attaccare un ospite. Per questo non devono trarre in inganno l'IR e l'EIR: una proporzione di circa 25 contatti infetti per mille può sembrare un valore basso ma deve essere messo in relazione con il numero di acari che ogni notte svolge il pasto di sangue su ciascun animale, stimato intorno ai 50.000 nei casi di infestazione più massiva, condizione questa che aumenta notevolmente le probabilità di trasmissione della malattia.

CONCLUSIONI

Le ricerche presentate in questo lavoro dimostrano senza ombra di dubbio che galline affette da tifoosi aviare possono infettare *D. gallinae* con *S. Gallinarum*, e che il germe può essere a sua volta trasmesso dall'acaro ad animali sensibili.

Il controllo efficace della malattia non potrà pertanto prescindere dal concomitante contenimento della popolazione infestante di acari, da realizzare attraverso una gestione integrata (Integrated Pest management, IPM) che preveda, accanto ai trattamenti con acaricidi, anche l'implementazione di buone pratiche igieniche e di biosicurezza.

BIBLIOGRAFIA

1. Sigournault-Flochlay A, Thomas E and Sparagano O. (2017) Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasit. Vectors*. 10: 357.
2. Kilpinen O, Roepstorff A, Permin A, Nørgaard-Nielsen G, Lawson LG and Simonsen HB. (2005) Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behavior and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Br. Poult. Sci*. 46: 26-34.
3. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OAE and Zenner L. (2009) The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp. Appl. Acarol*. 48: 93-104.
4. Shivaprasad HL and Barrow PA. (2013) Pullorum disease and fowl typhoid. In: Swine DE, (ed.), *Diseases of Poultry, thirteenth edition*. John Wiley & Sons, Ames, pp. 678-693.
5. Zeman P, Štika V, Skalka B, Bártík, Dusbábek F and Lávičková M. (1982)

- Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullorosis-typhus in hens. *Folia Parasitol. (Praha)* 29: 371-374.
6. Pugliese N, Circella E, Marino M, De Virgilio C, Cocciolo G, Lozito P, Cafiero MA and Camarda A. (2019) Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar Gallinarum in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*. *Med. Vet. Entomol.* 33: 162-170.
 7. Pugliese N, Circella E, Pazzani C, Pupillo A and Camarda A. (2011) Validation of a seminested PCR approach for rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum. *J. Microbiol Methods* 85: 22-27.
 8. Biggerstaff BJ. (2009) PooledInfRate, version 4.0: a Microsoft® Office Excel® add-in to compute prevalence estimates from pooled samples. Centers for Disease Control and Prevention. Fort Collins, USA. <https://www.cdc.gov/westnile/resourcepages/mosqSurvSoft.html> Ultimo accesso 12 luglio 2019.
 9. Nepomichene TNJJ, Tata E and Boyer S. (2015) Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. *Malar. J.* 14: 475.
 10. Macdonald G. (1961) Epidemiologic models in studies of vector-borne diseases. *Public Health Rep.* 76: 753-764.

EVOLUZIONE DEL GENOTIPO QX IN PRESENZA DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI

Franzo G., Legnardi M., Tucciarone C.M., Drigo M., Martini M., Cecchinato M.

Università degli studi di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)

Summary

Despite less frequent than antimicrobial resistance, some episodes of vaccine failures have been demonstrated and appear relatively common in intensively-raised livestock.

Infectious bronchitis virus (IBV) is a widespread avian coronavirus, whose control relies mainly on extensive vaccine administration. However, the continuous emergence of new vaccine-immunity escaping variants prompts the development of new vaccines.

In the present work, a large-scale molecular epidemiology study was performed to evaluate the role of homologous vaccination in driving IBV evolution, benefiting from the introduction of a new vaccine in the vast majority of Northern-Italy broiler farms in late 2014. The results of several biostatistic analyses evaluating the Spike-protein S1 subunit evolution consistently demonstrated the presence of a higher pressure in the post-vaccination period. A tendency towards diversification was detected essentially in sites located on the protein surface, within or nearby domains involved in viral attachment or related functions. These evidences suggest the action of a vaccine-induced immunity in conditioning viral evolution, potentially leading to the emergence of new vaccine-escape variants. Extending far beyond the poultry industry, the great plasticity of rapidly-evolving RNA-viruses in response to human intervention is demonstrated once more, highlighting the clear implications for animal and especially human health.

INTRODUZIONE

La Bronchite infettiva (BI) è una malattia infettiva di primaria importanza per l'avicoltura, essendo responsabile di rilevanti perdite economiche a livello mondiale.

L'agente eziologico, avian infectious bronchitis virus (IBV) è un membro della specie *Avian coronavirus*, genere *Gammacoronavirus*, famiglia *Coronaviridae*. Come gli altri membri della famiglia, si caratterizza per una grande variabilità antigenica e fenotipica, conseguente all'alto tasso di mutazione e di ricombinazione. Le conseguenze di questa variabilità sono particolarmente evidenti nel caso dello *Spike* virale (ed in particolare della sub-unità S1), proteina strutturale implicata nel tropismo cellulare, nel legame recettoriale e nell'induzione dell'immunità cellulare e umorale neutralizzante (Jackwood et al., 2012). La grande variabilità genetica dell'S1 è stata inoltre sfruttata per la classificazione di IBV in genotipi e *lineage*, i quali possono differire significativamente per proprietà biologiche, immunologiche e distribuzione geografica (Valastro et

al., 2016).

Le implicazioni per il controllo della malattia sono oramai ben note. Attualmente, il controllo della malattia si basa in massima parte sull'uso della vaccinazione. Tuttavia, le peculiarità fenotipiche dei diversi genotipi o addirittura di specifici ceppi esitano frequentemente in fenomeni di limitata cross-protezione, richiedendo l'uso di combinazioni di vaccini al fine di aumentare lo spettro di protezione e lo sviluppo di nuovi vaccini, per fronteggiare l'emergenza o l'introduzione di nuovi genotipi (Cook et al., 1999).

Sebbene questo scenario sia ampiamente assodato, le reali forze implicate nell'evoluzione di IBV sono tuttora poco conosciute. Infatti, un elevato tasso di mutazione o ricombinazione non si traduce automaticamente in un'elevata variabilità biologica: acciocché nuove varianti fenotipiche possano persistere e diffondersi queste devono essere favorevolmente selezionate dall'ambiente. È facilmente intuibile come l'immunità dell'ospite, sia essa naturale o di origine vaccinale, possa rappresentare uno dei maggiori fattori in grado di condizionare l'evoluzione virale. Nel caso di IBV sembrano sussistere diverse condizioni affinché l'immunità vaccinale possa condizionare l'evoluzione virale, selezionando specifici ceppi e favorendo l'emergere di nuove varianti. L'applicazione massiva e precoce della vaccinazione e l'elevato *turn-over* degli animali determinano la replicazione e l'evoluzione virale in un "ambiente" condizionato essenzialmente dall'immunità vaccinale, piuttosto che da quella naturale. La protezione solo parziale indotta dai vaccini attualmente disponibili permette con una certa frequenza la circolazione, anche prolungata, di ceppi di campo in allevamenti vaccinati e potrebbe ulteriormente favorire la selezione di *vaccine-escape variants*. Sebbene teoricamente plausibili, conferme sperimentali a supporto di tale ipotesi nel caso di IBV sono, ad oggi, mancanti (Read and Mackinnon, 2010).

Il presente lavoro si propone di studiare l'impatto della vaccinazione sull'evoluzione dei ceppi di campo del genotipo QX (*lineage* GI-19), beneficiando del particolare scenario determinatosi in Italia. Un radicale cambiamento nelle strategie di controllo ha infatti interessato una parte rilevante delle aziende del Nord Italia, permettendo di dividere chiaramente il periodo dello studio in una fase precedente e successiva all'introduzione della vaccinazione omologa nei confronti di questo genotipo (Franzo et al., 2016).

MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni e sequenziamento

Quattrocentodieci campioni (pool di tamponi tracheali), ottenuti da diversi allevamenti del Nord Italia nel periodo 2012-2017, precedentemente risultati positivi per IBV utilizzando il kit Virus-IBV-kit (Gensig, Southampton, UK) sono stati amplificati e sequenziati nella regione ipervariabile del gene S1 utilizzando i *primer* XCE1 and XCE2 descritti da Cavanagh et al., (1999) (Cavanagh et al., 1999). Al fine di ottenere una genotipizzazione preliminare, le sequenze ottenute più quelle di riferimento proposte da Valastro et al. (2016) sono state allineate utilizzando il software MAFFT (Standley, 2013) e un albero filogenetico è stato ricostruito utilizzando IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). I

ceppi classificati come QX sono stati selezionati e, quando possibile, la regione codificante l'intera sub-unità S1 è stata amplificata e sequenziata utilizzando dei primer disegnati utilizzando Primer3 (disponibili su richiesta).

Analisi di sequenza

Tutte le sequenze della sub-unità S1 sono state allineate con TranslatorX, tenendo conto della loro natura codificante, e la genotipizzazione è stata confermata utilizzando l'approccio precedentemente descritto. Eventuali ceppi ricombinanti sono stati identificati ed esclusi utilizzando RDP4 (Martin et al., 2015). Le sequenze così ottenute sono state suddivise in 2 dataset, corrispondenti al periodo antecedente e successivo all'introduzione della vaccinazione omologa (i.e. Novembre 2014).

I dataset così ottenuti sono stati quindi analizzati con diversi metodi statistici, basati sull'analisi dei tassi di sostituzione sinonimo e non-sinonimo, al fine di valutare e comparare l'intensità delle pressioni selettive agenti sui ceppi di IBV circolanti in diversi "ambienti vaccinali". In particolare è stata valutata, in modo indipendente su ciascuno dei due dataset, la presenza di siti proteici sottoposti a pressioni selettive diversificanti (i.e. determinanti un aumento della variabilità della sequenza aminoacidica fra i diversi ceppi) o direzionali (i.e. determinanti una tendenza dei ceppi a introdurre un particolare aminoacido in una specifica posizione della proteina), pervasive (i.e. costanti nel corso del tempo) o episodiche (i.e. attive solo in certi periodi della storia evolutiva). In aggiunta, l'insorgenza di pressioni selettive diversificanti e direzionali dopo l'introduzione della vaccinazione omologa è stata valutata contestualmente sui due dataset, selezionando il periodo precedente all'introduzione della vaccinazione come *baseline*.

Homology modeling della sub-unità S1 dei ceppi italiani.

Al fine di meglio comprendere il significato biologico delle pressioni selettive agenti sui ceppi considerati, la struttura terziaria di un ceppo rappresentativo fra quelli campionati è stata ricostruita tramite *homology modeling* utilizzando il server SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018). Il modello ottenuto è stato quindi editato e visualizzato con Chimera.

RISULTATI

Analisi delle sequenze e stima delle pressioni evolutive

Centocinquantacinque campioni sono stati preliminarmente classificati come appartenenti al genotipo QX; per 95 di questi è stato possibile ottenere la sequenza dell'intera subunità S1. In tutti i casi la genotipizzazione preliminare è stata confermata. Un ceppo ricombinante QX-793B e quattro sequenze risultate geneticamente identiche a quelle del vaccino somministrato (tutte campionate nel periodo post-vaccinazione) sono state escluse dallo studio. Nel dataset finale sono state quindi incluse 90 sequenze, di cui 39 campionate nel periodo pre-vaccinazione e 51 nel post-vaccinazione.

L'analisi delle pressioni selettive diversificanti pervasive (i.e. agenti in modo costante nel tempo) ha evidenziato una più intensa pressione dopo l'introduzio-

ne della vaccinazione, in particolare nella regione compresa fra gli aminoacidi 300 e 400 (Figura 1).

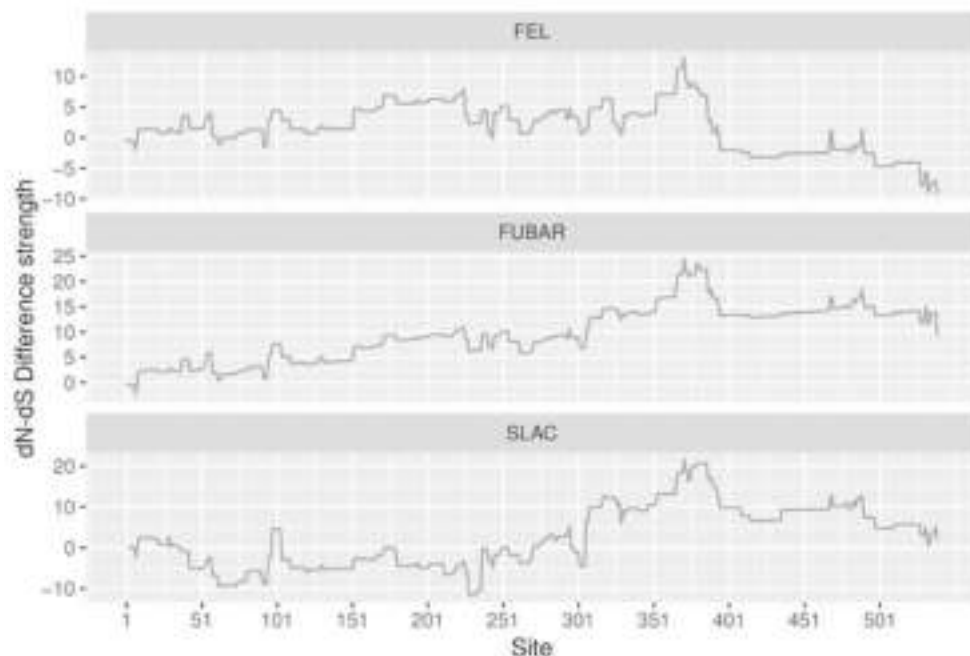


Figura 1) Plot rappresentante lo score cumulativo (calcolato con 3 distinti approcci statistici) basato sulla differenza fra tasso di mutazioni non sinonimo e sinonimo (dN-dS) nel periodo precedente e successivo all'introduzione della vaccinazione omologa. Punteggi maggiori di 0 indicano una più intensa pressione selettiva nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione omologa.

Tuttavia, in nessuno di questi siti la differenza è risultata statisticamente significativa. Al contrario, nei ceppi campionati dopo l'introduzione della vaccinazione omologa, è stato possibile identificare siti dell'S1 (aa 9, 29, 54, 65, 96 e 483) sottoposti ad una pressione selettiva diversificante episodica (i.e. agenti in specifici momenti del processo evolutivo della specie) statisticamente significativa. Similmente, l'analisi congiunta dei due dataset ha evidenziato l'insorgenza sia di pressioni diversificanti (aa 9, 65, 225 and 483) che direzionali (aa 29, 394 and 486) nei ceppi campionati nel periodo post-vaccinazione.

Homology modeling

La ricostruzione della struttura quaternaria dello *Spike* ha permesso di identificare la localizzazione dei siti sottoposti a pressioni selettive (Figura 2). In generale, i siti esposti sulla superficie dell'S1 sono risultati sottoposti a pressioni selettive diversificanti più intense nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione omologa. In particolare, la regione in cui tale differenza è risultata più marcata corrisponde al dominio C-terminale dell'S1, dove sono stati identificati dei potenziali siti per il lega-

me recettoriale. Diversi siti sottoposti a pressioni selettiva direzionale sono risultati in stretta prossimità al sito di legame recettoriale prima citato e a un altro potenziale sito di legame, localizzato nel dominio N-terminale della proteina. Tutti i siti della proteina che si sono dimostrati essere interessati da pressione selettiva episodica diversificante sono risultati essere esposti sulla superficie della sub-unità S1 (Figura 2).

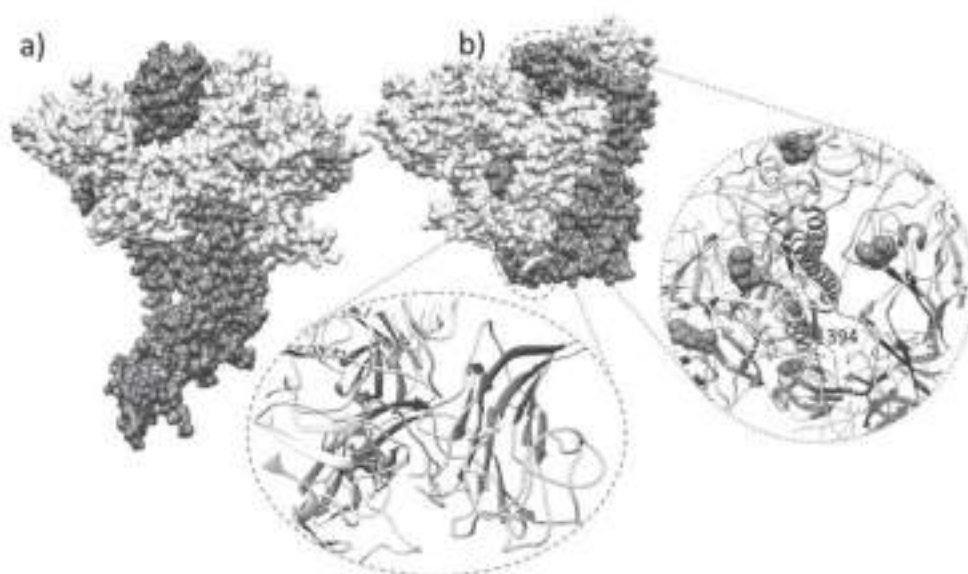


Figura 2) Vista laterale (a) e dall'alto (b) della struttura quaternaria dello Spike di IBV. La struttura completa dello *Spike* è riportata solamente per un monomero (in grigio), mentre la regione dell'S1 è riportata per i restanti 2 monomeri. Nel monomero colorato, le differenze nelle pressioni selettive fra il periodo precedente e successivo all'introduzione della vaccinazione sono state codificate con una scala colori dal viola (più intense nel periodo post-vaccinazione) all'azzurro (più intense nel periodo pre-vaccinazione). Nel restante monomero (bianco), i siti sottoposti a pressioni episodiche diversificanti o direzionali nel periodo post-vaccinazione omologa sono riportati rispettivamente in rosso e verde. La regione con il più alto dN-dS *score* (AA 300-400) (vedi anche Figura 1) è evidenziata in giallo. Con una visualizzazione a "ribbon" sono stati evidenziati i domini proteici più rilevanti: l'inserto inferiore riporta il sito di legame recettoriale nell'N-terminale della proteina e la struttura ad ansa che funge da "copertura" (in verde), mentre l'inserto sulla destra riporta il dominio C-terminale con il corrispondente sito recettoriale (in verde). Per entrambi gli inserti i siti sottoposti a pressioni selettive sono evidenziati con il codice colore precedentemente descritto.

DISCUSSIONE

L'intervento umano ha modificato drammaticamente l'ambiente in cui evolvono i patogeni. L'esempio più evidente e attuale è probabilmente quello dell'emergenza e diffusione dei fenomeni di resistenza a farmaci antimicrobici e antivirali. I virus a RNA appaiono particolarmente avvantaggiati in questa "corsa agli armamenti" contro i trattamenti introdotti dall'uomo in virtù della loro grande capacità di mutare ed evolvere rapidamente. Nonostante ciò, i vaccini sono stati a lungo considerati molto resistenti nei confronti dell'evoluzione virale (Kennedy and Read, 2017). Le ragioni che preven- gono o limitano l'emergenza di varianti in grado di eludere l'immunità vaccinale sono molteplici, ma fra le più rilevanti va considerata la capacità della vaccinazione di dimi- nuire o azzerare la popolazione di ospiti suscettibili e la replicazione virale. Poiché la selezione naturale è più efficace in grandi popolazioni, la selezione delle varianti più *fit* è limitata in presenza di piccole popolazioni. Inoltre, i vaccini inducono un'immunità *multi-target* e variabile in funzione del singolo soggetto, rendendo improbabile il con- testuale sviluppo di tutte le mutazioni fenotipiche necessarie ad eludere l'eterogenea risposta dell'ospite, specie a livello di popolazione (Kennedy and Read, 2017).

Nonostante ciò, con sempre maggior frequenza, vari studi hanno dimostrato la pre- senza di significative eccezioni, anche in medicina veterinaria, in particolare in specie allevate in modo intensivo quali suini e pollame (Franzo et al., 2016; Read and Mackinnon, 2010).

Il presente studio, effettuato in condizioni di campo (eludendo in questo modo i *bias* determinati dalle condizioni sperimentali) appare confermare l'interazione fra immu- nità indotta dalla vaccinazione ed evoluzione virale. Infatti, pressioni selettive più in- tense sono state osservate in azione su ceppi del genotipo QX campionati dopo l'in- troduzione della vaccinazione omologa. Diversi siti localizzati sulla superficie della proteina sono risultati sottoposti ad una pressione selettiva episodica, diversificante o direzionale, solamente nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione.

In particolare, una delle regioni dove è stato possibile osservare la maggiore differenza in termini di intensità delle pressioni selettive corrisponde ad una regione nel dominio C-terminale dell'S1, dove è localizzato un potenziale sito di legame recettoriale (Figu- ra 2) (Shang et al., 2018). È possibile che anticorpi aventi come target questa regione possano dimostrare una maggiore attività neutralizzante, inducendo di conseguenza pressioni selettive più intense. Simili ipotesi possono essere chiamate in causa per giu- stificare la presenza di siti sottoposti a pressioni selettive nelle regioni 24-62 e 87-93 dell'S1 (o in stretta prossimità a queste), dove precedenti studi hanno evidenziato la presenza di epitopi (Zou et al., 2015). Infine, altri 2 siti (i.e. 483 e 487), che hanno rive- lato una tendenza al cambiamento dopo l'introduzione della vaccinazione, risultano in stretta prossimità con una struttura ad ansa che costituisce una sorta di "copertura" per un altro sito di legame recettoriale, localizzato nell'estremità N-terminale dell'S1 (Fu- gura 2) (Shang et al., 2018). È stato infatti suggerito che questa "copertura" si sia evo- luta nel corso della storia dei coronavirus per proteggere i siti di legame della risposta immunitaria. Anticorpi in grado di legarsi in prossimità di queste regioni potrebbero quindi alterare o inibire la funzionalità di siti vitali per l'infettività virale, direttamente o tramite interferenza sterica.

Sulla base di queste evidenze, e in funzione della congruenza fra i siti sottoposti a pres- sione selettiva e la loro funzione biologica, appare lecito sostenere che la variazione

nelle strategie vaccinali abbia condizionato l'evoluzione dei ceppi del genotipo QX in Italia, potenzialmente favorendo quelle varianti meno suscettibili all'immunità vaccinale. Le reali cause alla base delle pressioni selettive determinate dalla vaccinazione, soprattutto in medicina veterinaria, non sono ancora del tutto chiare. Com'è noto, l'immunità indotta nei confronti di IBV non è sterilizzante, e una certa replicazione anche negli animali vaccinati è stata più volte dimostrata. Questo scenario è ulteriormente peggiorato dalla copertura solo parziale che spesso è possibile ottenere in allevamento e che, sebbene usualmente sufficiente a prevenire o limitare l'insorgenza di segni clinici, permette una prolungata circolazione dei ceppi di campo in una popolazione solo parzialmente immune. Tali debolezze potrebbero consentire la presenza di una popolazione virale abbastanza grande da permettere alla selezione naturale di agire, favorendo le varianti virali più adatte al nuovo "ambiente vaccinale". In funzione della vaccinazione precoce e della breve vita degli animali, è facile sostenere che l'immunità vaccinale sia la forza dominante nel modellare l'evoluzione virale. La presenza di un unico ceppo vaccinale (a differenza dei molteplici ceppi di campo) e la limitata variabilità genetica degli animali potrebbe favorire la presenza di un'immunità di popolazione più omogenea, e quindi la selezione di specifiche mutazioni.

Ulteriori studi saranno chiaramente necessari per confermare la validità di queste ipotesi. Nel frattempo, una cura particolare dovrebbe essere dedicata alla gestione e ottimizzazione delle strategie vaccinali già implementate, soprattutto al fine di minimizzare la circolazione di IBV e conseguentemente il suo potenziale evolutivo. L'utilizzo di una combinazione di vaccini eterologhi rappresenta una comune alternativa alla vaccinazione omologa. Poiché una maggiore eterogeneità nella risposta immunitaria è spesso annoverata fra i benefici di questa strategia, questa potrebbe ulteriormente ostacolare l'emergenza di varianti in grado di eludere la risposta vaccinale. Conseguentemente, gli eventuali benefici e limiti di una vaccinazione eterologa rispetto a quella omologa dovrebbero essere attentamente valutati e considerati al fine di definire delle linee guida per una vaccinazione ottimale.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., Naylor, C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28, 593–605. doi:10.1080/03079459994399
2. 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 Pathol.* 28, 477–485. doi:10.1080/03079459994506
3. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Nofrarías, M., Biarnés, M., Cortey, M., Majó, N., Catelli, E., Cecchinato, M., (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34, 5670–5676. doi:10.1016/j.vaccine.2016.09.014
4. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M. (2016). Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci. Rep.* 6. doi:10.1038/srep39458
5. Jackwood, M.W., Hall, D., Handel, A. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1305–1311. doi:10.1016/j.mee-

- gid.2012.05.003
6. Kennedy, D.A., Read, A.F. (2017). Why does drug resistance readily evolve but vaccine resistance does not? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284, 20162562. doi:10.1098/rspb.2016.2562
 7. Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1, 1–5. doi:10.1093/ve/vev003
 8. Read, A.F., Mackinnon, M.J.(2010). Pathogen evolution in a vaccinated world. *Evol. Heal. Dis.* 2, 139–152. doi:10.1093/acprof:oso/9780199207466.003.0011
 9. Shang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Liu, C., Geng, Q., Luo, C. (2018). Cryo-EM structure of infectious bronchitis coronavirus spike protein reveals structural and functional evolution of coronavirus spike proteins 1–19.
 10. Standley, K. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.(outlines version 7). *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010 [doi]
 11. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W232–W235. doi:10.1093/nar/gkw256
 12. Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 39, 349–364. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.015
 13. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. doi:10.1093/nar/gky427
 14. Zou, N., Xia, J., Wang, F., Duan, Z., Miao, D., Yan, Q., Cao, S., Wen, X., Liu, P., Huang, Y. (2015). Two novel neutralizing antigenic epitopes of the s1 subunit protein of a QX-like avian infectious bronchitis virus strain Sczy3 as revealed using a phage display peptide library. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 168, 49–55. doi:10.1016/j.vetimm.2015.08.008

SINERGIA TRA ANTIBIOTICI CONVENZIONALI E ANTIMICROBICI NATURALI CONTRO *ESCHERICHIA COLI*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ED *ENTEROCOCCUS CECORUM*

Giovangoni G.¹, Tugnoli B.², Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{1,3}

¹ DIMEVET, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO), Italy

² Vetagro S.p.A., via Porro, 2 - 42124 - Reggio Emilia (Italy)

³ Vetagro, Inc., 230 S. Clark St., # 320, 60604 Chicago (IL), USA

Summary

Since antibiotic resistance has become an important global issue, it is necessary to find adjuvant molecules with the aim to increase antibiotics efficacy against developing resistant bacteria. In this context, it may be interesting to use antimicrobial compounds, such as organic acids and botanicals, commonly used as feed additives and known for their antimicrobial properties.

Aim of this study was to evaluate the susceptibility of *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus cecorum*, three major poultry pathogens responsible for colibacillosis, necrotic enteritis and bacterial chondronecrosis with osteomyelitis respectively, against both antibiotics and antimicrobial compounds. For this purpose, the inhibitory activity of some conventional antibiotics and antimicrobial compounds, such as organic acids and botanicals, against several field strains of *E. coli*, *C. perfringens*, and *E. cecorum* was assessed through the Minimal Inhibitory Concentration test. After the first screening, combinations of selected antibiotics and organic acids or botanicals were tested in order to evaluate whether antibiotics efficacy could be increased by the synergy with alternative antimicrobials.

The results showed that antibiotic resistance varied among the bacteria species, but also a marked strain-specific variability of resistance patterns was observed. On the contrary, the antimicrobial effect of organic acids and botanicals was not species-specific, moreover it was observed that these substances were always effective with a dose-dependent effect, even when antibiotics failed.

In several strains selected combinations of antibiotics and organic acids or botanicals were able to increase bacterial sensitivity to antibiotics.

Organic acids and botanicals may therefore be a valid solution to the issue of antibiotic resistance, because their inclusion in the diet as feed additives can really increase *E. coli*, *C. perfringens*, and *E. cecorum* sensitivity to conventional antibiotics.

INTRODUZIONE

La colibacillosi, l'enterite necrotica e la spondilite enterococcica, anche detta condronecrosi con osteomielite batterica (BCO), sono tre patologie che causano importanti riduzioni delle performance di crescita e notevoli perdite economiche nell'allevamento avicolo. La colibacillosi trasmessa da ceppi patogeni aviari di *Escherichia coli* (APEC) è la principale causa di morbilità e mortalità nel pollo (1). Sebbene esistano diversi patotipi, tra cui alcune forme extraintestinali, la forma più comune è quella intestinale (2). Gli animali infetti si mostrano letargici, possono essere soggetti a problemi respiratori e, nei casi più gravi, ad episodi diarroici

debilitanti (3).

L'enterite necrotica, causata da *Clostridium perfringens* e spesso associata a problemi di coccidiosi in allevamento, è caratterizzata da necrosi ed infiammazione del tratto gastrointestinale. La forma subclinica è la più critica per l'industria avicola, determinando un alto tasso di mortalità e drastici cali di produttività (4).

Enterococcus cecorum è un componente del microbiota intestinale di diversi mammiferi e volatili. È stato recentemente riconosciuto come patogeno emergente a livello globale ed agente eziologico della BCO (5), provocando necrosi del tessuto cartilagineo ed infiammazione di osso e midollo osseo in diversi siti di lesione suscettibili al rapido accrescimento che contraddistinguono i polli da carne, tra cui la vertebra T4 e la testa di femore e tibia. Sebbene la patogenesi non sia ancora chiara, si ipotizza che ceppi patogeni traslochino dall'intestino al circolo sanguigno, raggiungendo i siti di lesione sopracitati e colonizzandoli (6,7).

Diverse sono le resistenze ad antibiotici convenzionali riportate in letteratura per quanto riguarda queste specie batteriche. L'antibiotico-resistenza è un tema di rilevanza globale, attualmente critico anche nell'ambito dell'allevamento avicolo. Ad oggi è essenziale ricercare molecole, alternative o adiuvanti l'azione degli antibiotici, al fine di evitare un ulteriore declino nell'efficacia dell'azione di questi farmaci: una soluzione a questo problema potrebbe essere l'utilizzo di acidi organici (OA) e composti naturali identici (NIC) in sostituzione o in associazione agli antibiotici.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

I ceppi di *E. coli*, *C. perfringens* ed *E. cecorum* sono stati isolati da allevamenti italiani di polli da carne: nel dettaglio, sono stati isolati 8 ceppi di *E. coli* da fegato, 10 ceppi di *C. perfringens* da intestino, e 10 ceppi di *E. cecorum*, di cui 4 isolati da intestino, 4 da testa del femore, e 2 da colonna vertebrale. I batteri sono stati identificati con appositi kit e coltivati in infuso cuore e cervello (BHI) a 37°C, in aerobiosi o anaerobiosi a seconda delle condizioni di crescita.

Test antimicrobici

Il valore di minima concentrazione inibente (MIC) di diverse sostanze è stato determinato con test di microdiluzione in piastre 96-well, attraverso la misurazione dell'assorbanza a 630 nm dopo 24 ore di incubazione con l'utilizzo di uno spettrofotometro.

Innanzitutto, 9 antibiotici (amoxicillina, ampicillina, bacitracina, doxiciclina, lincomicina, neomicina, penicillina G, tiamulina, tilosina), 8 acidi organici (OA1 – OA8) e 4 composti naturali identici (NIC1 – NIC4) sono stati testati da soli rispetto ai ceppi presi in esame. In base ai risultati di questi screening preliminari, combinazioni di antibiotici ed acidi organici o composti naturali identici sono state selezionate al fine di valutare un'eventuale sinergia tra il farmaco e le molecole antimicrobiche.

RISULTATI

Antibiotici

I pattern di resistenza agli antibiotici testati sono presentati nella Tabella 1.

	<i>E. coli</i> (n = 8)	<i>C. perfringens</i> (n = 10)	<i>E. cecorum</i> (n = 10)
AMX	8	10	10
BAC	NT	8 2	3 7
LIN	8	6 1 1 2	6 1 3
PEN	8	10	10
	NT		
TYL	NT	1 2 1 2 2 2	6 2 2

Tabella 1: Frequenza delle concentrazioni minime inibitorie in mg/L degli antibiotici testati contro i ceppi di *E. coli*, *C. perfringens* ed *E. cecorum*

AMX = amoxicillina; AMP = ampicillina; BAC = bacitracina; DOX = doxiciclina; LIN = lincomicina; NEO = neomicina; PEN = penicillina G; TIA = tiamulina; TYL = tilosina NT = non testato

Gli 8 ceppi di *E. coli* hanno mostrato un'inequivocabile resistenza alla maggior parte degli antibiotici testati, fatta esclusione per la doxiciclina, per la quale la risposta è stata abbastanza eterogenea. Le due specie Gram positive (*C. perfringens* e *E. cecorum*) sono invece risultate sensibili al gruppo delle penicilline (amoxicillina, ampicillina e penicillina G), e resistenti alla neomicina. Per diversi antibiotici è stata osservata una distribuzione bimodale dei valori MIC: in particolare, per *C. perfringens* nei confronti di lincomicina, tilosina e tiamulina, e per *E. cecorum* nei confronti di lincomicina e tilosina. I ceppi di entrambe le specie sono risultati sensibili a bacitracina e doxiciclina, mentre solo quelli di *E. cecorum* sono risultati sensibili alla tiamulina.

Antibiotici + OA/NIC

OA1, OA2, OA3, NIC1, NIC2 e NIC3 sono stati testati in combinazione con amoxicillina (64, 32, 16 mg/L) e neomicina (32, 16, 8 mg/L) contro *E. coli*. NIC1 (50% della MIC) ha permesso di migliorare l'azione di neomicina fino alla concentrazione più bassa testata nei ceppi di *E. coli*, mentre l'attività della amoxicillina è risultata invariata.

OA1, OA4, NIC1, NIC3 e NIC4 sono stati testati in combinazione con bacitracina (1, 0.75, 0.5 mg/L) e lincomicina (64, 32, 16 mg/L) contro *C. perfringens*. Nei 6 ceppi risultati resistenti alla lincomicina, grazie a NIC3 (75% della MIC), l'antibiotico ha riacquisito completa efficacia fino a 16 mg/L. NIC1 (37.5% della MIC) e NIC3 (37.5% della MIC) hanno invece aumentato l'azione di concentrazioni di bacitracina inferiori alla MIC.

OA1, OA2, OA4, OA5, NIC1, NIC2, NIC3 e NIC4 sono stati testati in combinazione con lincomicina, neomicina e tilosina (64, 32, 16 mg/L) contro *E. cecorum*. Mentre l'azione di lincomicina e tilosina è risultata pressoché inalterata dall'aggiunta di acidi organici e composti naturali identici, OA5 (50% della MIC) ha riattivato l'azione della neomicina fino a 32 mg/L.

DISCUSSIONE

In generale, sono state osservate numerose resistenze rispetto agli antibiotici testati in questo studio. La risposta dei ceppi nei confronti di alcuni antibiotici, come lincomicina e tilosina, è stata molto variabile: la bimodalità nella frequenza dei valori MIC è riportato in letteratura come risultato dell'emergenza e della diffusione della resistenza agli antibiotici (8).

Gli antibiotici da testare in combinazione con OA e NIC sono stati selezionati in base ai pattern di resistenza osservati in questo studio ed in letteratura, oltretutto in base al loro utilizzo nel trattamento di queste patologie.

È stato già dimostrato che i NIC permettano l'elusione di diversi meccanismi di resistenza batterici nei confronti degli antibiotici. In primo luogo, è noto come questi composti favoriscano l'ingresso di OA all'interno della cellula batterica grazie alla formazione di pori sulla membrana, producendo un'azione antibatterica sinergica (9). Lo stesso meccanismo potrebbe avvenire con gli antibiotici, facilitandone l'entrata. Inoltre, i NIC hanno la capacità di inibire l'estrusione dei farmaci dalla cellula, andando ad inibire le pompe di membrana (10,11).

Il ruolo degli OA nel migliorare l'azione degli antibiotici è meno chiaro, sebbene possa esserci una correlazione con l'azione antimicrobica di queste molecole:

dissociandosi all'interno della cellula, in primo luogo acidificano il pH provocando il consumo di energia batterica nel tentativo di estrarre gli ioni H⁺, inoltre danneggiano la replicazione del DNA grazie all'azione tossica dell'anione (12,13).

CONCLUSIONI

In questo studio diverse combinazioni di acidi organici e composti naturali identici hanno permesso il miglioramento dell'azione di diversi antibiotici rispetto a ceppi di campo di *E. coli*, *C. perfringens* ed *E. cecorum*. Si può quindi dedurre come queste molecole, utilizzate come alternativa o in supporto agli antibiotici, possano essere un valido espediente per combattere il fenomeno dell'antibiotico resistenza in avicoltura, andando anche a diminuire i rischi per il consumatore.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dr. Messina per avere fornito i ceppi utilizzati in questo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Front Vet Sci.* 2017;4:126.
2. Morabito S. Pathogenic Escherichia coli. Caister Academic Press; 2014. 316 p.
3. Geetha M. Avian Colibacillosis - A Mini Review. *Int J Pure Appl Biosci.* 2018 Feb 28;6:376–80.
4. M'Sadeq SA, Wu S, Swick RA, Choct M. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Anim Nutr.* 2015 Mar 1;1(1):1–11.
5. Dolka B, Chrobak-Chmiel D, Czopowicz M, Szeleszczuk P. Characterization of pathogenic Enterococcus cecorum from different poultry groups: Broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. *PLoS ONE.* 2017 Sep 21;12(9).
6. McNamee PT, Smyth JA. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. *Avian Pathol J WVPA.* 2000 Aug;29(4):253–70.
7. Wideman RF. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review. *Poult Sci.* 2016 Feb 1;95(2):325–44.
8. Temime L, Boëlle PY, Courvalin P, Guillemot D. Bacterial resistance to penicillin G by decreased affinity of penicillin-binding proteins: a mathematical model. *Emerg Infect Dis.* 2003 Apr;9(4):411–7.
9. Grilli E, Piva A. Organic acids and their role in reducing foodborne pathogens in food animals. NOVA Science Publishers; 2012.
10. Miladi H, Zmantar T, Chaabouni Y, Fedhila K, Bakhrouf A, Mahdouani K, et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against foodborne pathogens. *Microb Pathog.* 2016 Oct;99:95–100.
11. Karumathil DP, Nair MS, Gaffney J, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Trans-Cinnamaldehyde and Eugenol Increase Acinetobacter baumannii Sensitivity to Beta-Lactam Antibiotics. *Front Microbiol.* 2018 May 23;9.
12. Bearson S, Bearson B, Foster JW. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1997 Feb 15;147(2):173–80.
13. Cetin-Karaca H. Evaluation of Natural Antimicrobial Phenolic Compounds Against Foodborne Pathogens. Paper. 2011 Jan 1;



A/H1N1PDM(09) IN TACCHINI DA RIPRODUZIONE

Gobbo F., Zecchin B., Canevaro A., Zanardello C., Scolamacchia F., Bonfante F., Terregino C.

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

Summary

After its first detection in humans in Mexico (2009), the A/H1N1pdm(09) infection was also described in the poultry industry, and specifically in turkey breeder flocks. Previous works assumed that farm workers might be the first cause of infection of turkey hens *via* contaminated equipment during artificial insemination procedures, which is a unique prerogative of this poultry category. Previously described cases reported that affected flocks did not show abnormal mortality or other clinical signs except for a sudden and drastic egg drop associated to economic loss. In the majority of cases, phylogenetic analyses of avian samples showed a high similarity of the virus isolates with the human circulating A/H1N1pdm(09), suggesting the occurrence of a reverse zoonosis.

In April 2019, a turkey breeder company contacted the Official Veterinary Authority to complain about a sudden and drastic drop in egg production in mature hens.

60 tracheal swabs and 30 blood sera from each barn of the farm (hens in barn 1-2-3 and stags in barn 4) were collected and submitted to the laboratory for type A Influenza virus analysis.

Only tracheal swabs from animals of barns 3 and 4 tested positive for type A Influenza virus and negative for H5, H7 and H9 subtype. Further molecular analyses and Sanger sequencing showed that clinical specimens collected from hens and stags presented a high similarity (99-100%) with the human A/H1N1pdm(09) strains isolated in 2018-2019, thus reinforcing the hypothesis of a reverse zoonosis occurrence. The infection observed in stags turned out to be particularly surprising, considering that they had not been directly manipulated for artificial insemination, thus suggesting a possible horizontal transmission of the virus between barns. In order to shed light on this theory and gain more exhaustive information on the pathogenesis of the infection, additional samples from hens and stags were collected. Preliminary results of Whole Genome Sequencing (WGS) from tracheal clinical specimens showed nucleotide point mutations associated to possible mechanism of virus adaption to the avian host. These preliminary findings underline the need to implement high biosecurity measures during the artificial insemination procedures of turkey hens in order to avoid the human-animal transmission of influenza A virus in turkeys, which may act as potential source of emerging viruses through adaptive changes and reassortment, posing a risk for both human and animal health.

INTRODUZIONE

Il virus A/H1N1pdm(09) è stato descritto per la prima volta nell'uomo in Messico e da allora, oltre che nella popolazione umana, è stato isolato a livello globale nel settore suinicolo ed avicolo. Tra le specie avicole allevate, la categoria produttiva

colpita è stata sempre quella del tacchino da riproduzione e specificatamente le femmine mature, con marcato ed improvviso calo della ovideposizione (*Egg Drop*) in assenza di mortalità anomala o di altra sintomatologia riferibile ad infezione da virus influenzali. Lo studio di filogenesi del virus, a partire da campioni clinici aviari, ha sempre dimostrato una elevata similarità con i ceppi circolanti umani e in alcuni casi una completa omologia con isolati clinici di operatori avicoli sintomatici coinvolti nelle pratiche di inseminazione artificiale (IA), suggerendo quindi l'occorrenza di una *reverse-zoonosis*.

Ne consegue, che l'inseminazione artificiale, prerogativa di questo settore avicolo, rappresenti il più importante determinante nell'instaurarsi dell'infezione nel tacchino da riproduzione e l'ipotesi più plausibile è che le tacchine si infettino durante le pratiche di manipolazione associate all'inseminazione artificiale, attraverso il contatto diretto con secrezioni infette umane o con attrezzature contaminate dalle stesse. Le infezioni sperimentali in tacchini di diverse età e attraverso diverse vie di inoculo hanno individuato nella via intrauterina la modalità di infezione primaria responsabile dell'insorgenza di *Egg Drop*. In tutti i casi descritti in letteratura il calo/blocco dell'ovideposizione ha presentato un andamento autolimitante con ritorno in pochi giorni alla deposizione ma con *performance* produttive ridotte rispetto allo *standard*.

Lo scopo del presente lavoro è quello di riportare i risultati di approfondimenti diagnostici effettuati dopo la prima conferma di laboratorio di infezione da A/H1N1pdm(09) in tacchine da riproduzione associato a drastico ed improvviso calo dell'ovideposizione e all'evidenza di infezione e *shedding* virale anche nei maschi riproduttori dell'azienda.

MATERIALI E METODI

Conferma diagnostica di A/H1N1pdm(09) -15 Aprile 2019: il laboratorio di Virologia Speciale e Sperimentazione dell'IZSVE ha confermato l'infezione di A/H1N1pdm(09) in 4 capannoni di una azienda di tacchini da riproduzione (cap. 1-2-3 femmine di 48 settimane; cap. 4 maschi).

La diagnosi iniziale è stata eseguita su campioni ufficiali (60 tamponi tracheali e 30 sieri di sangue raccolti da ogni capannone) dopo segnalazione aziendale di un drastico ed improvviso calo dell'ovideposizione in assenza di mortalità, di sintomatologia respiratoria e/o enterica e di alterazioni nell'assunzione di cibo ed acqua.

I risultati delle analisi molecolari e sierologiche hanno consentito di evidenziare un'infezione pregressa nei capannoni 1-2 dove si era già instaurato il blocco dell'ovideposizione (animali negativi in rRT-PCR e marcatamente positivi sierologicamente) e uno stadio di infezione acuta nel capannone 3, associata ad iniziale e marcata diminuzione dell'ovideposizione (animali positivi in rRT-PCR e con inizio di sieroconversione), e nel capannone 4 dei maschi (positivi in rRT-PCR e negativi sierologicamente).

Infine il sequenziamento *Sanger* dei campioni positivi del capannone 3 e 4 ha consentito di classificare il ceppo virale come virus A/H1N1pdm (09) con il 99-100% di similarità con i ceppi umani dell'epidemia 2019.

Campionamento: di concerto con l'Azienda si è quindi deciso di approfondire il caso con successivi campionamenti, volti a comprendere meglio la patogenesi

dell'infezione e specificatamente il tropismo virale per l'apparato riproduttore nelle femmine, nonché i possibili meccanismi alla base della trasmissione/diffusione virale al capannone 4 dei maschi, che presenta in termini gestionali una netta separazione funzionale con i capannoni delle femmine.

Inoltre scopo di questo studio è stato valutare la possibile trasmissione verticale del virus, la possibilità di *egg-borne dissemination* e la presenza di immunità passiva nella progenie di un giorno di vita.

Per tali fini sono stati conferiti al laboratorio a diversi intervalli nel tempo (aprile-giugno 2019):

-tamponi tracheali e cloacali delle femmine (cap. 3) e dei maschi (cap. 4) per studio di *shedding* virale (rRT-PCR e WGS)

-sieri di sangue (cap. 3 e 4) per sierologia in ELISA e HI con antigene omologo A/Verona/IT/2810/09)

-carcasse di tacchino femmina per esami di anatomia patologica, studio del tropismo virale in rRT-PCR ed istopatologia (E-E ed IHC)

-5 *pool* di sperma per trasmissione verticale venerea (rRT-PCR)

-52 uova beccate scarto schiusa per rRT-PCR da guscio esterno (*egg-borne dissemination*) e da *pool* di organi dell'embrione (trasmissione verticale alla progenie)

-47 tacchinotti di un giorno per sierologia in ELISA e HI (immunità passiva) e rRT-PCR da *pool* di organi (trasmissione verticale alla progenie)

-34 tacchinotti di un giorno di vita (DOA-*Dead On Arrival*-) per rRT-PCR da *pool* di organi (trasmissione verticale alla progenie)

Infine, i dati produttivi di ovideposizione forniti dalla compagnia sono stati analizzati allo scopo di studiare l'evoluzione spazio-temporale dell'infezione all'interno dell'allevamento nei diversi capannoni di femmine, considerando l'andamento delle *performances* produttive e i relativi tempi di ripresa delle stesse a seguito dell'infezione.

RISULTATI

-tamponi tracheali e cloacali (cap. 3 e 4): i risultati delle analisi su queste matrici hanno consentito di evidenziare uno *shedding* virale a livello respiratorio e cloacale sia nelle femmine che nei maschi fino ad 8 giorni dopo la conferma diagnostica di A/H1N1pdm(09). Nella fase tardiva di infezione lo *shedding* cloacale risulta essere predominante. Nell'ultimo campionamento (circa 8 settimane dalla conferma iniziale) gli animali hanno presentato negatività sia da tampone tracheale che cloacale.

I dati preliminari di WGS (*Whole Genome Sequencing*) su campioni clinici respiratori del cap. 3 e 4 hanno permesso di mettere in evidenza mutazioni amminoacidiche associate a meccanismi di adattamento del virus A/H1N1pdm(09) all'ospite aviare, che potrebbero avallare l'ipotesi di trasmissione orizzontale anche nei maschi.

-sieri di sangue: gli animali di tutti i 4 capannoni hanno mostrato una marcata sieroconversione sia in ELISA che tramite test dell'inibizione dell'emoagglutinazione con titoli elevati (1:1024-1:2048), con diminuzione degli stessi dopo circa 8 settimane dalla conferma.

-carcasse delle femmine: le diverse metodiche diagnostiche applicate agli organi hanno confermato il tropismo virale per l'apparato riproduttore e nel contempo un coinvolgimento sistemico dell'infezione in particolare a carico di sierose della cavità celomatica, trachea, parenchima pancreatico e delle tonsille cecali.

-trasmissione verticale ed *egg-borne dissemination*: le analisi eseguite sulle matrici sperma, guscio di uova beccate scarto schiusa, e *pool* di organi di embrioni e/o tacchinotti di un giorno di vita non hanno evidenziato segni di trasmissione verticale.

-immunità passiva: il 23 % dei tacchinotti testati alla schiusa per anticorpi materni è risultato positivo sia al test ELISA sia in HI (1:64-1:128).

Infine, l'andamento delle curve di ovideposizione (Fig. 1) ha messo in evidenza un calo medio di produzione di uova del 46% ed una *Egg Drop* a carattere autolimitante, seguita da una ripresa all'ovideposizione di tutti i gruppi ma con un calo medio di *performance* rispetto allo *standard* del 16%.

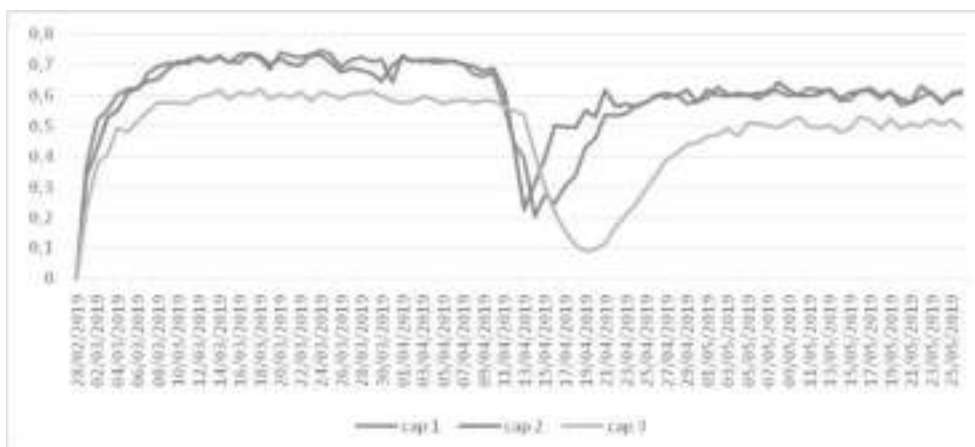


Fig. 1 Curve di deposizione dei diversi capannoni

Le curve di deposizione hanno mostrato delle tempistiche variabili di calo e ripresa tra i tre capannoni; nello specifico il capannone 1 dall'inizio del calo ha raggiunto il blocco di produzione dopo circa tre giorni, il capannone 2 dopo due giorni e il capannone 3 dopo sei giorni. Anche la durata della ripresa ha presentato tempistiche diverse tra i capannoni: per il capannone 1 circa sette giorni, tre giorni per il capannone 2 e sette giorni per il capannone 3.

E' inoltre interessante notare che gli animali campionati in prossimità o dopo il l'arresto della ovideposizione (cap. 1 e 2) sono risultati negativi in rRT-PCR e positivi sierologicamente con alti titoli; mentre le femmine del capannone 3 sottoposte a monitoraggio nel tempo, hanno presentato marcata positività in trachea e cloaca durante il calo dell'ovideposizione (con iniziale sieroconversione) e positività da organi delle carcasse conferite 4 giorni *post* blocco dell'ovideposizione.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio sottolineano ancora una volta la possibilità di infezione delle tacchine da riproduzione con il virus A/H1N1pdm(09), con conseguente danno produttivo associato a improvviso e drastico calo dell'ovideposizione. Sebbene in questo caso non sia stata accertata la modalità di introduzione virale è molto probabile che sia stata associata ad un operatore infetto e alle pratiche di inseminazione artificiale alle quali le tacchine venivano sottoposte due volte alla settimana a giorni alterni. Una particolarità di questo caso diagnostico rispetto a quelli fin ora riportati in letteratura è l'evidenza di infezione nei maschi con *shedding* virale respiratorio e cloacale fino a 8 giorni *post* diagnosi e marcata sierconversione (titoli anticorpali in HI fino a 1:4096).

Gli studi condotti sulle carcasse hanno permesso di evidenziare un tropismo specifico per l'apparato riproduttore, che spiegherebbe il momentaneo calo e blocco della ovideposizione, ma anche la disseminazione dell'agente virale in altri organi, nello specifico trachea, pancreas e intestino (tonsille cecali). Parallelamente i dati preliminari di WGS hanno evidenziato in alcuni campioni clinici tracheali (soggetti del cap. 3 e cap. 4) la presenza di mutazioni amminoacidiche associate a meccanismi di adattamento del virus alla specie aviaria, che potrebbero avvalorare l'ipotesi di trasmissione orizzontale inter-capannone incluso quello dei maschi. Nonostante il tropismo virale per l'ovidutto, le analisi svolte per la valutazione della trasmissione verticale alla progenie e la *egg-borne dissemination* hanno escluso tali possibilità.

I dati laboratoristici (rRT-PCR e sierologia) integrati con i dati produttivi di ovideposizione suggeriscono che per la diagnosi virologica di A/H1N1pdm(09) sia utile campionare gli animali durante i primi giorni associati al calo dell'ovideposizione con tamponi tracheali e cloacali poiché gli animali campionati *intra vitam* nei giorni durante l'arresto della deposizione risultavano positivi solo sierologicamente.

CONCLUSIONI

L'evidenza di infezione dei tacchini da riproduzione con il virus pandemico umano (*reverse-zoonosis*) sottolinea l'importanza del rispetto dei principi della biosicurezza in allevamento, delle buone pratiche di igiene e lavorazione e della profilassi vaccinale antiinfluenzale degli operatori del settore avicolo, e nello specifico delle squadre impegnate nella pratica di inseminazione artificiale in questa categoria produttiva.

L'elevata e riconosciuta suscettibilità della specie tacchino nei confronti di virus influenzali tipo A (anche a bassa patogenicità) deve essere tenuta in considerazione per possibili meccanismi di adattamento e riassortimento tra l'H1N1pdm(09) e virus aviari con possibili rischi per la sanità pubblica e animale.

BIBLIOGRAFIA

1. C. Mahieu, V. Moreno, A. Gonzalez, A. Rivera, J. Fuller, C. Jara, C. Lecocq, M. Rojas, A. Garcia, M. Vasquez, M. Agredo, C. Gutierrez, H. Escobar, C. Ternicier, P. Avalos. *Pandemic (H1N1) 2009 in Breeding Turkeys, Valparaiso, Chile*. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, Vol. 16, No.4
2. C. Terregino, R. De Nardi, R. Nisi, F. Cilloni, A. Salviato, M. Fasolato, I.

- Capua. *Resistance of turkeys to experimental infection with an early 2009 Italian human Influenza A(H1N1)v virus isolate*. Eurosurveillance, 2009, 14:19360
3. M. Pantin-Jackwood, J.L. Wasilenko, E. Spackman, D. Suarez, D. Swayne. *Susceptibility of turkeys to pandemic-H1N1 virus by reproductive tract insemination*. Virology Journal, 2010, 7:27
 4. -Y. Berhane, D. Ojkic, N. Pople, O. Lung, J. Pasick. *Reoccurrence of suspected hyman-to-turkey transmission of H1N1 Pandemic 2009 Virus in Turkey Breeder Flocks in Ontario and Manibota, 2016*. Transboundary and Emerging Diseases, 2016, Vol 63:6
 5. Sjurseth, Siri & Gjerset, Britt & Bragstad, Karoline & Hungnes, Olav & Wisløff, Helene & Er, Chiek & Valheim, Mette & M. Løtvedt, Siri & David, Bruce & A. Hanssen, Skjalg & H. Hauge, Siri & Hofshagen, Merete. (2017). *Human to animal transmission of influenza A(H1N1)pdm09 in a turkey breeder flock in Norway*. Infection Ecology & Epidemiology, 2017, Vol. 7, 1416249

IMPATTO DELLE STRATEGIE VACCINALI SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV) NEL CONTESTO ITALIANO

Legnardi M., Franzo G., Tucciarone C. M., Drigo M., Cecchinato M.

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

Summary

A retrospective study was performed on infectious bronchitis virus (IBV) positive samples collected in the period 2012-19 in broiler farms in Northern Italy. The considered farms faced a change in the adopted vaccination protocol at the beginning of 2015, shifting from a combination of Mass and 793B vaccines to the administration of Mass and QX ones. The aim of this study was to evaluate the impact of vaccination changes on IBV epidemiology and molecular diagnosis.

In the considered period, the most frequently detected lineages were QX (70%), 793B (16%) and Mass (12%), with sporadic detections of Q1, D274 and recombinant strains. The relative frequencies of QX and 793B detections remained constant after the vaccination change, while a significant rise was observed in Mass detections after the introduction of QX homologous vaccines. Rather than to an increase in Mass population size, this phenomenon may be caused by the different interactions that Mass vaccines have with 793B and QX-based vaccines, the former possibly hindering the detection of Mass strains more easily than the latter. While further studies seem necessary to shed light on this complex subject, the herein presented data seem to suggest that the adopted vaccination should be taken into account to aptly choose the more informative diagnostic assays and properly interpret the results and IBV epidemiology.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva (IBV), responsabile di diverse forme cliniche raggruppate sotto il nome di bronchite infettiva (BI), rappresenta una delle minacce di maggior rilevanza sia sanitaria che economica per l'avicoltura mondiale. Essendo un virus a ssRNA+, IBV è caratterizzato da una notevole variabilità genetica, la quale determina la continua comparsa di nuove varianti tra cui esistono differenze in termini di tropismo, patogenicità, localizzazione geografica e nel livello di cross-protezione garantito nei confronti di altri ceppi (Valastro et al., 2016).

Nonostante i vaccini vivi attenuati, che rappresentano uno strumento essenziale per un efficace controllo della sintomatologia, siano utilizzati routinariamente negli allevamenti intensivi, il loro utilizzo non è esente da svantaggi. Ceppi di origini vaccinale possono diffondersi a popolazioni non vaccinate, oltre a poter andare sporadicamente incontro a fenomeni di rivirulentazione o di ricombinazione con ceppi di campo (Jackwood and Lee, 2017; Moreno et al., 2017). La pressione immunologica determinata dalla vaccinazione sembra inoltre contribuire all'incremento del tasso di mutazione di IBV (Jackwood et al., 2012). Ciononostante, l'impatto che essi hanno sull'epidemiologia di IBV viene scarsamente tenuto in considerazione.

Per valutare come cambiamenti nelle strategie vaccinali possano modificare l'epide-

miologia molecolare di IBV, uno studio retrospettivo è stato condotto su campioni prelevati nell'arco di sette anni in allevamenti di broiler appartenenti ad un'unica filiera produttiva, oggetto nel 2015 di una modifica nel piano vaccinale nei confronti di IBV.

MATERIALI E METODI

Lo studio retrospettivo ha preso in considerazione un totale di 491 *pool* di campioni, prelevati tra il giugno 2012 ed il maggio 2019 in allevamenti di broiler nel Nord Italia. Tra la fine del 2014 e l'inizio del 2015, in tali allevamenti è stato introdotto un vaccino basato sul *lineage* GI-19 (QX), che ha sostituito la vaccinazione basata sul *lineage* GI-13 (793B) adottata fino a quel momento. L'impiego di vaccini basati sul *lineage* GI-1 (Mass) è invece rimasto costante durante l'intero periodo considerato.

I campioni sono stati inclusi sulla base della positività per IBV ad uno screening preliminare condotto tramite qRT-PCR (Virus-IBV-kit (Gensig, Southampton, UK)). Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a RT-PCR usando i *primer* descritti da Cavanagh et al. (1999) ed a sequenziamento con metodo Sanger di una porzione della regione ipervariabile del gene S1. Solo i campioni per cui era disponibile una sequenza di qualità sufficiente a permetterne la genotipizzazione sono stati inclusi nello studio. La distinzione tra ceppi vaccinali e di campo è stata effettuata tramite comparazione con ceppi vaccinali di referenza, allineando le sequenze e misurandone la *p-distance* relativa alla regione sequenziata con il software MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Per l'analisi statistica dei dati, il livello di significatività è stato fissato a $P < 0.01$. La frequenza delle positività per i vari ceppi prima e dopo il cambio di strategia vaccinale è stata confrontata utilizzando il test chi quadrato di Pearson con correzione di Yates.

RISULTATI

Dei 491 campioni totali, 12 risultavano prelevati nel 2012, 61 nel 2013, 45 nel 2014, 192 nel 2015, 119 nel 2016, 42 nel 2017, 10 nel 2018 e 10 nel 2019.

I *lineage* più frequentemente ritrovati sono stati QX (70,2%), 793B (16,5%) e Mass (12,2%), con sporadici ritrovamenti di ceppi appartenenti ai *lineage* GI-16 (Q1) (1%), GI-12 (D274) (0,6%) e di ceppi ricombinanti (0,5%).

Il numero di positività relative ai vari *lineage* riscontrate in ciascun anno sono elencate in **tabella 1**.

Lineage	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	TOTALE
QX	7	38	38	141	83	19	8	6	340
793B	5	14	3	32	17	8	0	2	81
MASS	0	6	3	16	16	15	2	2	60
Q1	0	3	0	2	0	0	0	0	5
D274-like	0	0	1	1	1	0	0	0	3
ceppi ricombinanti	0	0	0	0	2	0	0	0	2
TOTALE	12	61	45	192	119	42	10	10	491

Tabella 1. Numero di positività totali e per ciascun *lineage* riscontrate annualmente.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti permettono di trarre alcune conclusioni generali sull'epidemiologia di IBV in Italia. Già ad una veloce analisi risulta evidente come QX sia stato il *lineage* di maggior rilevanza in Italia nell'ultimo decennio. QX è ritenuto responsabile della maggioranza dei casi clinici osservati in Italia nel periodo considerato (Franzo et al., 2017). Altri risultati degni di menzione sono l'assenza di identificazioni di ceppi Q1 negli ultimi quattro anni, e l'identificazione, limitata a due casi nel 2016, di ceppi riconosciuti come il risultato di eventi di ricombinazione tra ceppi 793B e QX (Moreno et al., 2017).

Passando alla valutazione dell'impatto del cambio di strategia vaccinale sull'epidemiologia di IBV, data la notevole difformità nel numero di campioni disponibili nei diversi anni, per ottenere risultati più robusti si è deciso di dividere il periodo considerato in tre intervalli: gli anni 2012-14, in cui il protocollo vaccinale prevedeva la somministrazione di vaccini Mass e 793B; l'anno 2015, in cui si è effettuata la transizione da vaccini 793b a quelli basati su QX; ed il periodo 2016-19, in cui sono stati impiegati vaccini Mass e QX.

Le differenze in termini di percentuali relative dei ceppi identificati nei diversi intervalli è descritta nel **Grafico 1**.

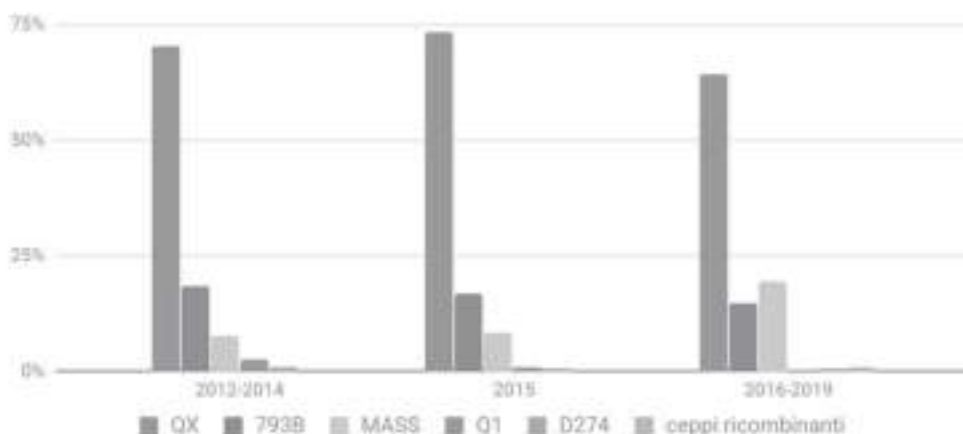


Grafico 1. Frequenza relativa di identificazione dei diversi *lineage* di IBV nei diversi periodi considerati.

La percentuale di ceppi appartenenti ai *lineage* QX e 793B si è mantenuta pressoché costante durante l'intero periodo considerato. A cambiare è presumibilmente l'origine dei ceppi: i ceppi identificati come QX prima dell'introduzione della vaccinazione omologa erano infatti esclusivamente ceppi di campo, mentre successivamente la maggioranza dei ceppi ritrovati aveva origine vaccinale.

Diverso il discorso per quando riguarda il ritrovamento di stipiti 793B: tutti i ceppi ritrovati sono risultati infatti di origine vaccinale, anche successivamente all'inter-

ruzione dell'uso di vaccini basati su questo *lineage*. Sebbene siano necessari ulteriori studi per determinare le ragioni alla base di questo ritrovamento, è possibile ipotizzare che ciò sia dovuto alla persistente circolazione di ceppi 793B all'interno del singolo allevamento e tra allevamenti diversi. Va infatti ricordato come altre filiere e allevamenti abbiamo continuato ad utilizzare vaccini basati sul genotipo 793B, determinandone una continua reintroduzione sul territorio.

Un aumento relativo si è osservato invece nel numero di ritrovamenti di ceppi Mass, tutti di origine vaccinale, nonostante l'utilizzo dei vaccini basati su questo *lineage* fosse rimasto invariato per tutto il periodo considerato. L'aumento nella frequenza di ritrovamenti di Mass nel periodo 2016-19 è infatti statisticamente significativa rispetto a quanto riscontrato sia nell'intervallo 2012-14 che nell'anno 2015. Una spiegazione a questo dato va presumibilmente ricercata nell'interazione tra i diversi vaccini utilizzati e nella natura della metodica effettuata per l'analisi. Nonostante la compresenza di più ceppi di IBV sia una condizione assolutamente comune per via della somministrazione di molteplici vaccini, tramite saggi di RT-PCR generici e successivo sequenziamento è infatti possibile rilevare la presenza di un solo ceppo, generalmente quello prevalente o quello con maggior affinità per i *primer* utilizzati. Si può dunque presumere che la differenza nel numero di ceppi Mass osservati prima e dopo il 2015 non sia adducibile ad una diversa dimensione della popolazione virale appartenente a questo *lineage*, bensì al fatto che la presenza di ceppi vaccinali Mass venga rilevata meno frequentemente con questa metodica, utilizzata per l'intero periodo di studio, quando co-somministrati con vaccini 793B rispetto che con vaccini basati su QX. Si è infatti osservato che in caso di co-somministrazione i vaccini basati su 793B sembrano caratterizzati da una maggior persistenza rispetto a quelli Mass (Tucciarone et al., 2018), che ne faciliterebbe quindi l'identificazione qualora il campionamento venisse eseguito dopo il ventesimo giorno d'età, come avvenuto per pressoché tutti i campioni considerati in questo studio. Al contrario, quando co-somministrati i vaccini basati su Mass sembrano caratterizzati da una maggiore persistenza e replicazione dei vaccini QX (Russo et al., 2016).

CONCLUSIONI

I dati presentati sembrano confermare come la scelta del protocollo vaccinale contro IBV possa avere significativi effetti pratici sull'epidemiologia molecolare di questo virus e conseguentemente sulla sua diagnosi, per cui le metodiche basate su PCR rappresentano uno strumento essenziale. La conoscenza dei vaccini utilizzati risulta quindi indispensabile per decidere quali saggi diagnostici utilizzare e per una corretta interpretazione dei risultati e dell'epidemiologia di IBV. Inoltre, dato che il controllo di IBV prevede sempre più comunemente la combinazione di due o più vaccini vivi basati su diversi ceppi, è evidente come studi che facciano luce sulle loro interazioni risultano sempre più necessari.

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. Franzo G, Tucciarone CM, Blanco A, Nofrarias M, Biarnés M, Cortey M,

- Majó N, Catelli E and Cecchinato M. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34: 5670–5676.
3. Jackwood MW, Hall D and Handel A. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1305–1311.
 4. Jackwood MW and Lee D-H. (2017). Different evolutionary trajectories of vaccine-controlled and non-controlled avian infectious bronchitis viruses in commercial poultry. *PLoS One* 12:e0176709.
 5. Kumar S., Stecher G and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870–1874.
 6. Moreno A, Franzo G, Massi P, Tosi G, Blanco A, Antilles N, Biarnes M, Majó N, Nofrarias M, Dolz R, Lelli D, Sozzi E, Lavazza A, Cecchinato M. (2017). A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. *Avian Pathol.* 46, 28–35.
 7. Russo E, Franzo G, Tucciarone CM, Longoni C and Cecchinato M. (2016). Evidenze di campo dell'efficacia della vaccinazione per Bronchite infettiva con ceppi Mass e QX nei confronti dell'infezione da ceppi di campo di genotipo Q1. 227-232. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria - I Simposio Scientifico SIPA - Parma, Italy, pp 227-232.
 8. Tucciarone CM, Franzo G, Berto G, Drigo M, Ramon G, Koutoulis KC, Catelli E, Cecchinato M. (2018). 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: 303–312.



RIDUZIONE DELLA PRESSIONE INFETTIVA DEL VIRUS DELL'ENTERITE EMORRAGICA A SEGUITO DELL'INTRODUZIONE DEL VACCINO VIVO ATTENUATO NELL'ALLEVAMENTO DEL TACCHINO

Lupini C.¹, Mescolini G.¹, Quaglia G.¹, Benedetti V.², Volorio A.², Catelli E.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)*

² *Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Milano*

Abstract

To improve Turkey Haemorrhagic Enteritis virus (THEV) control in turkey production, recently live attenuated vaccination has been temporary introduced in Italy. To monitor vaccine take and field virus circulation, a combined PCR and sequencing protocol for vaccine or field strain differentiation was applied in seven meat turkey flocks. Birds were THEV-vaccinated at four weeks of age with live (5 flocks) or inactivated (2 flocks) vaccines, then sampled by cloacal swabs weekly up to 10 weeks of age. Strains of vaccine origin were detected from 4 to 10 weeks of age in live-vaccinated flocks while field strains were detected from 7 to 10 weeks of age in birds receiving the inactivated vaccine. The observed persistence of the vaccine strain in live-vaccinated flocks can reduce field virus circulation.

INTRODUZIONE

L'enterite emorragica (HE) è una malattia virale del tacchino che colpisce soggetti a partire dalla quarta settimana di vita. In animali sensibili, la patologia è caratterizzata da depressione, morte improvvisa e feci sanguinolente ed è associata ad immunosoppressione. L'importanza economica di questa malattia è dovuta alla mortalità da essa provocata, che può raggiungere anche il 60%, ed alla presenza di una immunodepressione transitoria che può favorire l'insorgenza di altre patologie (Saunders et al., 1993). Studi di campo evidenziano che la malattia si manifesta più frequentemente in soggetti di 7-9 settimane di età (Fadly e Nezerian, 1982). Negli ultimi anni si riscontra principalmente la malattia in forma subclinica associata a mortalità per l'insorgenza di infezioni batteriche secondarie (Giovanardi et al., 2014). L'agente eziologico dell'enterite emorragica è *Turkey siadenovirus A* (genere *Siadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*) virus a DNA lineare a doppio filamento, comunemente denominato *Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus* (THEV). Recentemente per il controllo dell'Enterite Emorragica del tacchino è stato introdotto in Italia, con permesso di importazione temporaneo, un vaccino vivo attenuato ceppo *Domermuth*. Il presente lavoro è nato con l'obiettivo di monitorare la presenza di THEV mediante studi longitudinali in sette gruppi di tacchini vaccinati per THEV a quattro settimane di età con vaccino vivo (5 gruppi) o inattivato (2 gruppi). Tamponi cloacali sono stati eseguiti settimanalmente e processati per la caratterizzazione molecolare dei ceppi virali rilevati.

MATERIALI E METODI

Gruppi oggetto dello studio e campionamento

Sono stati inclusi nello studio 7 gruppi di tacchini da carne, situati in aree ad elevata densità avicola del Nord Italia. Gli animali sono stati oggetto di profilassi vaccinale per

Enterite Emorragica 28 giorni di vita con vaccino vivo attenuato ceppo *Domermuth* (gruppi 1-5) o spento (gruppi 6 e 7). Settimanalmente, da 4 a 10 settimane di età, da 10 animali per gruppo sono stati raccolti tamponi cloacali per la ricerca e la caratterizzazione di THEV mediante PCR e sequenziamento.

Estrazione del DNA virale

I 10 tamponi cloacali di ogni campionamento sono stati processati in pool e risospesi in 1 ml di PBS sterile. Il DNA virale è stato estratto utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) seguendo quanto riportato dal produttore.

Caratterizzazione molecolare di THEV

Per rilevare e caratterizzare THEV nei tamponi cloacali, è stato utilizzato un protocollo che prevede l'amplificazione ed il sequenziamento di due porzioni del genoma virale, sede di marker vaccinali utili per la differenziazione dei ceppi di campo dal ceppo vaccinale (Lupini et al., 2018). Brevemente, i campioni sono stati sottoposti ad una prima PCR che prevede l'amplificazione della regione 3' del gene ORF1 (primer *forward* 5'-CAGGGTAGCGCTTTGTC-3'; primer *reverse* 5'-ACATGCGTTTTT-GTTTTTCTTT-3'); i campioni risultati positivi sono stati ulteriormente amplificati nel gene hexon utilizzando primers riportati in letteratura (Giovanardi et al., 2014). Gli amplificati sono stati purificati utilizzando l'enzima ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (ThermoFisher Scientific) seguendo il protocollo del produttore e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Madrid, Spain). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate mediante il *software* Bioedit, allineate e confrontate con le sequenze di ceppi THEV precedentemente ottenute, o presenti nel database *GenBank*.

RISULTATI

I risultati della presenza e della caratterizzazione molecolare di THEV nei gruppi oggetto di studio sono riportati nella tabella 1.

Tabella 1. Caratterizzazione molecolare di THEV nei gruppi di tacchini inseriti nello studio.

Età (settimane)	Gruppo						
	1	2	3	4	5	6	7
4	-	-	-	-	-	n.e.	n.e.
5	-	-	-	+vaccino	-	n.e.	n.e.
6	-	-	+vaccino	-	+campo	-	n.e.
7	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+campo	n.e.
8	-	-	-	+vaccino	+vaccino	+campo	+campo
9	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+campo	+campo
10	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+vaccino	+campo	+campo

(-) Negativo a PCR per THEV

(+vaccino) Positivo a PCR per THEV (identità 100% ceppo vaccinale Domermuth)

(+campo) Positivo a PCR per THEV (identità 100% ceppo di campo)

(n.e.) non eseguito

Nei gruppi 1, 2, 3 e 4, vaccinati con vaccino vivo attenuato, sono stati rilevati persistentemente ceppi di origine vaccinale (da 5 a 10 settimane di vita). Tutti ceppi evidenziati mostravano 100% di identità nucleotidica con il ceppo vaccinale *Domermuth* nella regione 3' del gene ORF1 e nel gene hexon.

Nel gruppo 5, anche esso vaccinato con vaccino vivo attenuato, sono stati evidenziati sia un ceppo di campo (a 6 settimane di età) che un ceppi di origine vaccinale (7 a 10 settimane di vita).

Nei gruppi vaccinati con vaccino inattivato (6 e 7) sono stati rilevati ceppi THEV di campo (da 7 a 10 settimane di età).

Tutti i ceppi di campo evidenziati durante lo studio hanno mostrato 100% d'identità nucleotidica con virus circolanti nel nostro paese (Lupini et al., 2018)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stata monitorata la circolazione del virus dell'enterite emorragica del tacchino in gruppi di animali vaccinati con il vaccino vivo attenuato di recente importazione nel nostro paese o con vaccino spento. Come già precedentemente osservato (Giovanardi et al., 2014; Ceruti et al., 2007), nei gruppi vaccinati con vaccino spento THEV, è comune rilevare in maniera persistente durante il ciclo produttivo, la presenza del virus di campo dalla settima settimana di vita in poi. La presente indagine evidenzia come l'introduzione del vaccino vivo è in grado di ridurre o eliminare la circolazione dei ceppi di campo nel periodo considerato.

L'introduzione nel nostro paese del vaccino vivo attenuato può quindi favorire la riduzione della pressione infettiva di THEV nell'allevamento del tacchino, limitando la circolazione di questo agente immunosoppressivo virale.

BIBLIOGRAFIA

1. Beach NM, RB Duncan, CT Larsen, XJ Meng, N Sriranganathan and FW Pierson. (2009) Persistent infection of turkeys with an avirulent strain of turkey hemorrhagic enteritis virus. *Avian Diseases*. 53:370–375.
2. Ceruti R, Della Valentina M, Gavazzi L, Venni A, Ferrazzi V, Grilli G (2007) Haemorrhagic enteritis seroconversion in turkey breeders: field observations. *Ital J Anim Sci* 6:321–325
3. Giovanardi D, Lupini C, Pesente P, Rossi G, Ortali G 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.
4. Fadly AM and Nazerian K (1989) Hemorrhagic enteritis of turkeys: influence of maternal antibody and age at exposure. *Avian Dis.*; 33(4):778-86.
5. Lupini C, Mescolini G, Alastra G, Silveria F, Felice V and E Catelli (2018) Enterite emorragica del tacchino: caratterizzazione molecolare di ceppi circolanti in Italia. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2018. III Simposio Scientifico, Parma 14 Settembre 2018. pp. 131-134
6. Saunders GK, Pierson FW, Hurk JV (1993) Haemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: a comparison of virulent and avirulent virus infections, and a proposed pathogenesis. *Avian Pathol.*; 22(1):47-58.



GENOTIPIZZAZIONE DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* TRAMITE METODICA MLST: RISULTATI PRELIMINARI SU CAMPIONI ISOLATI DA IZSVE

Matucci A.¹, Stefani E.¹, Tondo A.¹, Dal Prà M.¹, Quaranta E.², Paladino A.¹, Bekő K.³, Gyuranecz M.³, Catania S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 Via San Giacomo 5, 37157 Verona (VR), Italia

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS5 Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia

³Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Hungária körút 21, Budapest 1143, Hungary

Summary

Mycoplasma gallisepticum (MG) causes chronic respiratory disease and decrease hatchability in many avian species, resulting in economic losses to the poultry industry. Nowadays, there is strong demand for efficient epidemiological investigation tools to distinguish MG strains in order to control pathogen spreading and disease. For this purpose, the Multilocus Sequence Typing (MLST) genotyping method has been recently developed (8) using a specific six *loci* analysis on housekeeping genes (*atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB*, *uvrA*). The aim of this study was to test with MLST a total of 77 MG positive samples, collected during 2010-2018 in the Mediterranean area and previously analysed at IZSVE through mycoplasma culture, identification and Gene Targeted Sequencing (GTS) genotyping of the *mgc2* gene (MGA_0932) (9). In our samples we found four new alleles in three *loci* and seventeen new Sequence Types (ST) were assigned. Analysis of MG vaccine ST confirmed ST14 for MG 6/85 and ST49 for TS-11, respectively grouped in Orange and Pink *mgc2* GTS groups, as expected. However, inside a *mgc2* GTS group different ST could be found, pointing out that MLST resolution is greater compared to GTS. Only two ST from Spanish chickens (ST15 and ST32) grouped into different GTS genotype, indicating a different evolution of structural and housekeeping genes. MLST evolutionary relatedness analysis indicates three major ST to be considered as putative clonal complex: ST112, ST26 and ST105. A sample was analysed after a total of 100 cultural passages and the ST (along with GTS) was constantly found. Overall these results demonstrate that MLST method is solid and reproducible, it gives a higher resolution in respect of single gene GTS and could be implemented for epidemiological studies of both vaccine and field MG strains.

INTRODUZIONE

Mycoplasma gallisepticum (MG) è un patogeno ampiamente diffuso che colpisce numerose specie avicole, può trasmettersi per via orizzontale (contatto diretto, aerosol, polveri, penne) ma la via principale di trasmissione è verticale da animale infetto alla progenie attraverso l'uovo (1). Crea tipicamente un quadro clinico respiratorio con sinusiti ed aerosacculiti con conseguente mortalità, ritardo nella crescita e scarti al macello oltre a mortalità embrionale. E' dunque un importante capitolo di perdite economiche per l'industria avicola (2). Per far fronte alla problematica sono disponibili sul mercato europeo vaccini vivi attenuati come il 6/85 (Nobilis® MG 6/85, MSD Animal Health) o il ts-11 (Vaxsafe® MG, Bioproperties Pty Ltd.). Risulta utile in ambito epidemiologico e

di sorveglianza sanitaria poter identificare e correlare i ceppi circolanti con i focolai di infezione ed inoltre poter differenziare i ceppi *wild* da quelli vaccinali. Differenti metodi molecolari sono stati messi a punto per identificare i ceppi (3,4,5), e quelli che risultano di maggiore interesse sono basati sul sequenziamento di particolari regioni geniche (*gene targeted sequencing*: GTS), come *mgc2* (CDS MGA_0932) (6) e 16S-23S rRNA-IGSR (7) ma non consentono una standardizzazione elevata dei dati ottenuti. Tra i metodi di genotipizzazione basati su sequenza con alto potere discriminatorio e sicuramente standardizzabile troviamo la metodica MLST (*multi locus sequence typing*), che si basa sull'analisi di mutazioni nella sequenza di un set scelto di geni *housekeeping*. Brevemente, ad ogni differente gene con specifiche mutazioni viene assegnato un numero che definisce un allele del gene stesso, la sequenza di alleli assegnati al set di geni creano un "sequence type" numerico (ST) univoco che identifica il ceppo di MG analizzato. Scopo di questo studio è stato quello di valutare la metodica MLST applicata a *Mycoplasma gallisepticum* e pubblicata recentemente (8) su campioni conferiti all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe) dal 2010 con differente provenienza geografica (bacino mediterraneo) e sottoposti ad isolamento e tipizzazione mediante analisi di sequenza del gene *mgc2* (9). Contestualmente è stata valutata la stabilità genetica che questa metodica riesce a rivelare nel tempo impiegando un ceppo dopo vari passaggi in coltura.

MATERIALI E METODI

Selezione dei campioni

Per lo studio in oggetto sono stati selezionati i seguenti campioni: i vaccini MG 6/85 e MG TS-11, il ceppo ATCC 19610, 76 campioni di campo provenienti da (58) polli, (13) tacchini, (2) oca, (2) faraona, (1) quaglia di differente categoria produttiva e precedentemente tipizzati mediante analisi di sequenza del gene *mgc2* e raggruppati/classificati come colore (Pink, Orange, Light-blue, etc..) secondo quanto precedentemente descritto (9). I campioni di MG selezionati per il presente studio sono rappresentanti dei principali genotipi storicamente evidenziati in IZSVe dal 2010: nr. 20 Green, nr. 20 del genotipo Pink (*ts-11 like*), nr. 12 Light blue, nr. 11 Orange (MG 6/85) e Orange-like (orange con 3bp di *mismatch*), nr. 12 Grey e Grey-like (Grey con delezione di 24 bp), solo 1 Black.

Isolamento da brodocolture

I ceppi selezionati sono stati coltivati mediante procedura interna (PDP DIA 014 rev. 01-9/11) basata sul manuale OIE [cap 2.7.4 del 2013 e cap 2.7.5 del 2014], con incubazione a 37° C al 5% di CO₂ in terreno liquido. La coltura è stata controllata giornalmente fino a cambiamento di colore e torbidità.

Estrazione del DNA

Il DNA genomico dei ceppi MG è stato estratto con metodo manuale impiegando il kit "QIAmp DNA mini KIT" (Qiagen) seguendo le istruzioni del kit per estrazioni da brodocoltura.

PCR MLST a 6 geni

Sono stati amplificati 6 geni *housekeeping* (*atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB*, *uvrA*) impiegando le coppie di *primer* descritte (8) con il kit qPCR Kapa FAST (Kapa Biosystem), su *real time* PCR BioRad CFX (BioRad) acquisendo il segnale di fluorescenza del *SYBR*

green in fase di reazione di elongazione. Il ciclo impiegato è stato: 95° C per 5' di attivazione, 35 cicli di 95° C per 1', 56° C per 30", 72° C per 1'.

Sequenziamento ed analisi di sequenza

I campioni amplificati nella precedente fase sono stati sequenziati su entrambi i filamenti per ogni gene impiegando BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (v 2.0 Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state valutate ed analizzate mediante software BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.6.1 (10) ed allineate con software MEGA7 mediante funzione ClustalW con un database di sequenze rappresentative dei differenti alleli già pubblicati per ognuno dei sei geni e già depositate in GenBank. Per ogni campione, in base alla sequenza numerica formata dal tipo di allele identificato in ogni *locus*, è stato assegnato l'ST del ceppo secondo quanto già pubblicato. Per combinazioni non presenti nelle 57 totali sinora descritte (8) sono stati assegnati nuovi ST partendo dal numero 100. La correlazione tra i differenti ceppi dopo assegnazione di ST è stata evidenziata creando un MST (*minimum spanning tree*) costruito usando l'algoritmo goeBURST full MST (11) in programma PHYLOViZ 2.0 usando la stringa dei 6 alleli identificati in ogni ceppo.

RISULTATI

Per quanto riguarda gli ST evidenziati nei campioni di riferimento, ts-11, MG 6/85 ed ATCC 19610, sono stati confermati gli stessi risultati MLST già pubblicati (8), rispettivamente: ST49, ST14 ed ST1. Tutti i campioni MG sottoposti al presente studio si sono inoltre dimostrati positivi per l'espressione/amplificazione dei sei geni *housekeeping* di interesse per eseguire l'analisi MLST. In tabella 1 sono riportati tutti gli ST assegnati nei campioni IZSVe del bacino mediterraneo analizzati ed inoltre i nuovi ST assegnati nel presente studio, derivanti sia da nuove combinazioni alleliche, sia da nuovi alleli sequenziati nei geni *fusA*, *rpoB* e *uvrA*. In tabella 2 sono riportati i singoli campioni sottoposti ad analisi, la loro provenienza geografica, la specie e il genotipo *mgc2* e ST assegnato. Dai risultati ottenuti si può evidenziare che:

1. Nei campioni analizzati sono stati identificati 36 differenti ST, 17 dei quali (da ST100 a ST116) sono di nuova assegnazione. ST1 è stato evidenziato solamente col ceppo ATCC 19610 vista anche la provenienza statunitense. ST101 è stato ritrovato solo in una farafona italiana precedentemente classificata con un genotipo *mgc2* poco rappresentato.
2. Mentre all'interno dei genotipi *mgc2* può essere considerato normale ritrovare ST differenti, è interessante notare che in ST15 ed ST32 sono stati invece ritrovati differenti genotipi *mgc2*.
3. Il ceppo vaccinale MG 6/85 risulta allocato nell'ST14 ed è classificato come genotipo Orange. Gli altri ceppi presenti nel medesimo ST possiedono lo stesso genotipo Orange e provengono da allevamenti con vaccinazione MG 6/85.
4. Il genotipo Pink che includeva anche il ceppo vaccinale TS-11, mostra al suo interno differenti ST, di cui i maggioritari risultano essere ST49 (24%) ed ST34 (19%). È interessante notare come il ceppo vaccinale TS-11 è classificato come ST49, e gli altri isolati appartenenti a questo ST provengono da allevamenti con tale tipo di vaccino.
5. I genotipi Grey, Light-blue e Green risultano frammentati con differenti ST anche se si può ritrovare un ST prevalente in essi (rispettivamente ST51, ST27 ed ST24).

Per rappresentare la distanza evolutiva dei vari ST identificati sotto forma di differenze alleliche, i dati MLST sono stati rappresentati mediante costruzione di un MST (figura 1). I nodi di maggiore intesse, perché putativi “genotipi ancestrali” di differenti ST con limitate differenze alleliche, risultano essere ST112 e ST26 ed ST105.

Per dimostrare la stabilità della metodica MLST impiegata, ovvero che il metodo analizza zone geniche non soggette a variazioni di sequenza durante numerosi passaggi colturali, il campione IZSVE/2012/1731-31f di tacchino da carne con origine Italia e genotipizzato Pink è stato mantenuto in coltura liquida per 100 passaggi successivi totali ed ha evidenziato in MLST il mantenimento di un profilo ST23 e genotipo Pink.

Tabella 1: profili ST di genotipizzazione mediante MLST ottenuti dai campioni conferiti in IZSVE 2010-2018. In grassetto gli ST di nuova assegnazione, in sfondo grigio nuovi alleli trovati nel presente studio e depositati su GenBank con numero di accesso provvisorio MN195114-MN195117.

ST	<i>atpg</i>	<i>dnaa</i>	<i>fusa</i>	<i>rpob</i>	<i>ruvb</i>	<i>uvra</i>
<i>1</i>	1	1	1	1	1	1
<i>6</i>	2	1	16	13	2	6
<i>8</i>	3	2	10	9	1	1
<i>14</i>	5	8	6	3	5	10
<i>15</i>	5	8	10	9	5	10
<i>18</i>	7	2	1	13	1	16
<i>22</i>	7	17	4	16	19	16
<i>23</i>	8	1	1	5	2	13
<i>24</i>	8	1	10	9	1	1
<i>26</i>	8	1	16	4	2	12
<i>27</i>	8	1	16	15	1	12
<i>28</i>	8	3	10	6	1	12
<i>32</i>	8	5	10	7	1	15
<i>33</i>	8	5	16	5	2	13
<i>34</i>	8	5	16	7	2	12
<i>39</i>	9	5	16	17	1	15
<i>41</i>	10	5	16	4	2	12
<i>49</i>	13	11	14	8	9	2
<i>51</i>	15	3	7	12	2	11
100	8	1	1	5	2	12
101	2	1	16	17	2	5
102	3	3	10	9	1	1
103	5	3	10	9	1	12
104	5	13	10	9	2	1
105	5	3	10	9	2	1
106	8	5	10	7	2	1
107	5	8	14	3	5	10
108	2	1	8	22	2	5
109	8	1	21	23	2	12
110	8	1	8	17	20	12
111	8	13	16	6	1	12
112	2	1	16	15	1	5
113	5	1	16	6	2	18
114	2	5	16	15	1	12
115	2	1	4	15	1	5
116	8	1	8	17	20	5

Tabella 2: campioni di MG analizzati descritti per specie ed origine e rispettivo profilo di genotipizzazione mediante MLST su 6 geni (ST) e tipo dopo analisi di sequenza *mgc2*.

<i>ID ceppo</i>	<i>Specie</i>	<i>Paese di origine</i>	<i>mgc2 tipo</i>	<i>ST</i>
<i>ATCC 19610</i>	coltura cellulare	nd	violet	<i>1</i>
<i>IZSVE/2016/3063-1</i>	pollo	Spagna	pink	<i>15</i>
<i>IZSVE/2012/1731-31f</i>	tacchino	Italia	pink	<i>23</i>
<i>IZSVE/2013/380-9f</i>	tacchino	Italia	pink	<i>23</i>
<i>IZSVE/2013/7016-10fp</i>	tacchino	Italia	pink	<i>26</i>
<i>IZSVE/2013/3963-9f</i>	goose	Italia	pink	<i>33</i>
<i>IZSVE/2013/6687-22f</i>	pollo	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2013/3457-5d</i>	tacchino	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2014/4852-1f</i>	tacchino	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2014/4853-1d</i>	tacchino	Italia	pink	<i>34</i>
<i>IZSVE/2016/115-2f</i>	pollo	Spagna	pink	<i>39</i>
<i>IZSVE/2013/5575-28dp</i>	pollo	Albania	pink	<i>41</i>
<i>IZSVE/2012/2546-2d</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2013/2857-1f</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2013/3185-5f</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2013/4957-5d</i>	pollo	Italia	pink	<i>49</i>
<i>MG TS-11</i>	vaccino	nd	pink	<i>49</i>
<i>IZSVE/2014/6082-8f</i>	quaglia	Italia	pink	<i>100</i>
<i>IZSVE/2013/4693-4f</i>	pollo	Italia	pink	<i>107</i>
<i>IZSVE/2014/6259-35fp</i>	pollo	Italia	pink	<i>109</i>
<i>IZSVE/2015/5870-1fp</i>	faraona	Italia	pink	<i>110</i>
<i>IZSVE/2016/400-12f</i>	pollo	Italia	pink	<i>111</i>
<i>IZSVE/2018/202-14d</i>	pollo	Spagna	orange like	<i>105</i>
<i>IZSVE/2012/1626-2f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2012/6164-1d</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2012/6166-1f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/1779-12f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/3462-14f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/3462-16f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/2741-1f</i>	pollo	Portogallo	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2014/2743-3f</i>	pollo	Portogallo	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2018/1839-47f</i>	pollo	Spagna	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2018/1844-1f</i>	pollo	Italia	orange	<i>14</i>
<i>MG 6/85</i>	vaccino	nd	orange	<i>14</i>
<i>IZSVE/2010/D/3037-1</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>
<i>IZSVE/2010/D/3038-2</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>
<i>IZSVE/2010/D/3283-2</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>
<i>IZSVE/2011/2247-10d</i>	pollo	Italia	Light blue	<i>27</i>

ID ceppo	Specie	Paese di origine	mgc2 tipo	ST
IZSVE/2012/4464-5f	pollo	Italia	Light blue	27
IZSVE/2010/D/2646-3	tacchino	Italia	Light blue	27
IZSVE/2010/D/2647-2	tacchino	Italia	Light blue	27
IZSVE/2016/3541-1fp	pollo	Italia	Light blue	113
IZSVE/2013/3914-2f	goose	Italia	Light blue	114
IZSVE/2011/6488-2d	tacchino	Italia	Light blue	115
IZSVE/2017/514-1f	tacchino	Italia	Light blue	116
IZSVE/2018/229-1f	tacchino	Italia	Light blue	116
IZSVE/2017/2479-8f	pollo	Spagna	grey like	32
IZSVE/2012/6194-14	pollo	Iraq	grey	18
IZSVE/2012/6194-5	pollo	Iraq	grey	18
IZSVE/2013/561-1f	pollo	Giordania	grey	22
IZSVE/2013/566-1fp	pollo	Giordania	grey	22
IZSVE/2013/3188-1f	pollo	Spagna	grey	32
IZSVE/2012/3057-1d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3057-2d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3058-1d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3058-2d	pollo	Spagna	grey	51
IZSVE/2012/3616-2f	pollo	Italia	grey	112
IZSVE/2013/3791-1fp	tacchino	Italia	grey	112
IZSVE/2015/980	pollo	Spagna	green	6
IZSVE/2011/5595-2d	pollo	Italia	green	8
IZSVE/2013/4360-1f	pollo	Spagna	green	15
IZSVE/2013/4360-2f	pollo	Spagna	green	15
IZSVE/2013/3061-1f	pollo	Italia	green	24
IZSVE/2014/3164-2f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2014/6088-1dp	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/2061-6f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/2063-2f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/388-7D	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2015/388-8f	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2017/3571-2dp	pollo	Spagna	green	24
IZSVE/2016/2581-3	pollo	Spagna	green	28
IZSVE/2017/2479-5f	pollo	Spagna	green	28
IZSVE/2014/6088-2f	pollo	Spagna	green	32
IZSVE/2011/5595-8f	pollo	Italia	green	102
IZSVE/2012/1183-4d	pollo	Spagna	green	103
IZSVE/2012/1216-4f	pollo	Spagna	green	104
IZSVE/2013/1772-2f	pollo	Spagna	green	106
IZSVE/2016/852-1f	tacchino	Italia	green	108
IZSVE/2010/2458-1f	faraona	Italia	black	101

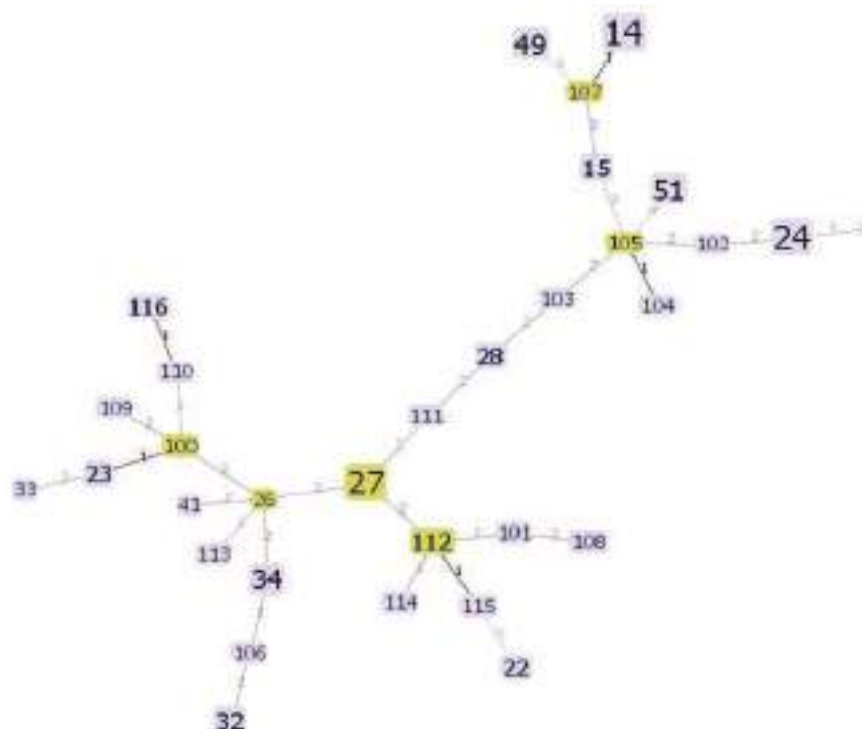


Figura 1: rappresentazione *minimum spanning tree* (full MST 5 Locus Variant level) dei dati MLST dei campioni analizzati, il numero nei nodi rappresenta l'ST mentre il numero nel tratto di *link* le differenze alleliche tra i due ST collegati.

DISCUSSIONE

L'analisi MLST dei campioni di riferimento conferma la riproducibilità della metodica applicata su *Mycoplasma gallisepticum* di recente pubblicazione (8). Inoltre si dimostra un'analisi solida riuscendo ad evidenziare un profilo ST costante sino a 100 passaggi in coltura, dimostrando che la regione analizzata dei geni interessati non accumula mutazioni casuali evidenziabili che ne fanno variare l'ST. La metodica in studio, applicata a campioni già genotipizzati impiegando analisi di sequenza del gene *mgc2* e raggruppati per gruppi omologhi (9), rende possibile una differenziazione genotipica superiore in quanto all'interno dei gruppi di colore si ritrovano differenti ST. Purtroppo occorre segnalare che sono stati evidenziati due *sequence type* (ST15 e ST32) appartenenti ad area geografica e provenienza definita (Spagna filiera industriale) che possono avere genotipo *mgc2* differente andando ad indicare che la ulteriore analisi di sequenza di più geni (in questo caso *housekeeping*) riesce a dare informazioni complementari rispetto una analisi GTS di un gene strutturale come la citoadesina. In questo caso ad esempio il risultato può risultare utile per un'analisi epidemiologica specifica e localizzata della circolazione di particolari ST. Ad esempio la maggiore prevalenza di ST14 (ceppo vaccinale 6/85) in galline ovaiole nella penisola iberica rispetto a ST49 (ceppo TS-11) in Italia,

potrebbe essere spiegato dalla differente tipologia di vaccinazione tra queste due zone geografiche, in Spagna è autorizzato solamente il vaccino ceppo 6/85.

L'analisi dei dati MLST riferita agli ST identificati (figura 1) è in grado inoltre di evidenziare anche la “vicinanza evolutiva” tra più ceppi identificati mediante algoritmo goeBURST (che si basa sulla computazione di differenze tra i profili numerici). Attualmente dai dati in nostro possesso solamente ST112 e ST26 risultano possibili candidati ad essere considerati Complessi Clonali (CC), in quanto con due sostituzioni alleliche (*Dual Locus Variant*) originano almeno 4 nuovi ST, mentre per ST105 che graficamente potrebbe apparire un buon candidato è opportuno segnalare che necessita di maggiori sostituzioni alleliche per generare nuovi “rami”. ST26 appartiene al genotipo Pink mentre ST112 a genotipo Grey ed entrambi risultano numericamente poco rappresentati nei campioni e genotipi analizzati, inoltre mentre gli ST discendenti più vicini ad ST26 risultano dello stesso genotipo *mgc2* (Pink) con la sola eccezione di ST27, mentre da ST112 non discende direttamente nessun genotipo Grey ma prevalentemente ST appartenenti al genotipo Light-blue. Per ST105 che appartiene al genotipo definito Orange-like, gli ST più prossimi sono tutti di genotipo Green.

CONCLUSIONI

La metodica MLST aumenta la potenza risolutiva della genotipizzazione mediante GTS ponendo le basi per una valutazione epidemiologica puntuale nel tempo e nello spazio della trasmissione di MG. Tale metodica, affiancata da una collezione continua dei dati potrà quindi permettere di meglio comprendere le correlazioni tra focolai, sistemi di diffusione e mantenimento di tale importantissimo patogeno gettando le basi all'implementazione puntuale delle misure di biosicurezza nei sui confronti.

BIBLIOGRAFIA

1. Levisohn, S., and S. H. Kleven. “Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*).” *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 19.2 (2000): 425-434.
2. Ley, David H., and H. W. Yoder Jr. “*Mycoplasma gallisepticum* infection.” *Diseases of poultry* 12 (2008): 807-834.
3. Gharaibeh, Saad, et al. “Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Jordan.” *Avian diseases* 55.2 (2011): 212-216.
4. Ferguson, Naola M., et al. “Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies.” *Microbiology* 151.6 (2005): 1883-1893.
5. Sulyok, Kinga M., et al. “Development of Molecular Methods for Rapid Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains from Field Isolates.” *Journal of clinical microbiology* 57.6 (2019): e01084-18.
6. Lysnyansky, Inna, Maricarmen García, and Sharon Levisohn. “Use of *mgc2*-polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism for rapid differentiation between field isolates and vaccine strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Israel.” *Avian diseases* 49.2 (2005): 238-245.
7. Raviv, Ziv, et al. “The *Mycoplasma gallisepticum* 16S–23S rRNA intergenic

- spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies.” *Avian diseases* 51.2 (2007): 555-560.
8. Bekő, Katinka, et al. “Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing.” *Veterinary microbiology* 231 (2019): 191-196.
 9. Rodio S., Moronato M.L., Sattin E., Matucci A., Gobbo F., Catania S. “*Mycoplasma gallisepticum* nel settore avicolo: studio dei ceppi circolanti negli ultimi tre anni” *Atti della Società Italiana di Patologia Aviare* 2014 pag. 189-191.
 10. Hall, Tom A. “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.” *Nucleic acids symposium series*. Vol. 41. No. 41. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999.
 11. Francisco, Alexandre P., et al. “Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach.” *BMC bioinformatics* 10.1 (2009): 152.



MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK IN ALLEVAMENTI DI BROILER E DI RI-PRODUTTORI PESANTI

Mescolini G.¹, Lupini C.¹, Quaglia G.¹, Berto G.², Tovani A.³, Ceroni S.³, Muccioli F.³, Catelli E.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia.*

² *CEVA Salute Animale, Agrate Brianza (MB), Italia.*

³ *Medico Veterinario.*

Summary

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative disease of chickens spread throughout the world caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2). Production losses resulting from clinical disease and MD-associated condemnation have been significantly reduced since the introduction of vaccination. The present study reports a GaHV-2 epidemiological survey conducted on Italian broiler and broiler-breeder birds vaccinated against MD. The virus was detected by a nested PCR protocol capable of amplifying the entire *meq* gene from environmental dust samples, allowing the molecular characterization of the detected GaHV-2 strains. Most viruses detected from the dust collected from broiler farms at the end of the production cycle were of vaccine origin, however, in 3 out of 22 farms, field viruses with molecular features of high virulence were detected. A broiler-breeder farm was monitored for four subsequent production cycles during the first 20 weeks of life of the birds. A highly virulent field virus was detected in all monitored cycles, despite the strictness of the cleaning and disinfection procedures applied. However, the time of infection of the birds was delayed and the amount of the environmental virus was reduced in the last two monitored cycles. Vaccination alone does not prevent the infection of birds with highly virulent viruses, therefore biosecurity measures remain essential for MD control.

INTRODUZIONE

La malattia di Marek (MD) è una patologia neoplastica a carattere linfoproliferativo del pollo causata dal *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), che determina ingenti perdite economiche nel settore avicolo in tutto il mondo (Schat e Nair, 2013).

Le manifestazioni cliniche della malattia vengono tenute sotto controllo dalla vaccinazione con vaccini vivi attenuati che tuttavia vengono definiti "imperfetti" poiché non sono in grado di prevenire l'infezione (Read et al., 2015). I vaccini impiegati più largamente in Italia sono il ceppo CVI988/Rispens (attenuato a partire da un ceppo di GaHV-2) e l'herpesvirus del tacchino (HVT), appartenente alla specie *Meleagrid alphaherpesvirus 1*.

Gli ospiti recettivi si infettano tramite inalazione di particelle virali presenti nei detriti delle cellule epiteliali dei follicoli delle penne desquamate contenute nella polvere ambientale (Carrozza et al., 1973); il virus può permanere vitale ed infettante nelle polveri per diversi mesi (Jurajda e Klimes, 1970).

Negli allevamenti di ovaiole e riproduttori pesanti Italiani circolano ceppi ad elevata

virulenza in grado di determinare la forma acuta della malattia, caratterizzata da linfomi viscerali (Mescolini et al., 2019b) e di recente sono stati segnalati episodi di MD in allevamenti di broiler nelle forme cutanea, di paralisi transitoria e di “alabama redleg”.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati di un’indagine epidemiologica sulla circolazione e persistenza ambientale di GaHV-2 in diversi allevamenti di broiler ed in un allevamento di riproduttori pesanti colpito da elevata mortalità attribuibile a MD.

Il virus è stato evidenziato in campioni di polvere ambientale mediante un protocollo di PCR nested, in grado di amplificare il gene *meq*, principale oncogene di GaHV-2, che nella sua sequenza genomica contiene marker vaccinali e di virulenza.

MATERIALI E METODI

Gruppi di broiler oggetto dello studio e campionamento

Nel 2018 e nel 2019 sono stati campionati 40 gruppi di broiler allevati con metodo convenzionale o biologico, appartenenti a 22 allevamenti situati nelle seguenti regioni italiane: Emilia Romagna, Friuli- Venezia Giulia, Marche, Lazio, Puglia, Veneto. I gruppi campionati erano vaccinati per MD con vaccino monovalente HVT o con vaccino bivalente HVT+CVI988/Rispens, somministrato *in ovo* o al primo giorno di vita. La concentrazione di GaHV-2 nelle polveri aumenta nel tempo all’aumentare dell’età del gruppo (Kennedy et al., 2017), perciò, per incrementare le possibilità di rilevare il virus, il campionamento veniva eseguito a fine ciclo. Il campionamento consisteva, dove possibile, nel prelievo di polvere ambientale dalle griglie dei ventilatori (in modo da coprire l’intera area del capannone) o nella esecuzione di tamponi ambientali (garze inumidite) effettuati in diversi punti del capannone.

Gruppi di riproduttori pesanti oggetto dello studio e campionamento

Nella stessa finestra temporale sono prelevati campioni di polvere ambientale dalla pulcinaia, costituita da 5 capannoni, di un allevamento di riproduttori pesanti in cui in passato si erano verificati focolai di MD acuta in fase di deposizione. Il campionamento è stato eseguito per quattro cicli consecutivi (I, II, III, IV) prelevando da ciascun capannone polvere ambientale come precedentemente descritto, o, quando il campionamento veniva eseguito post-pulizia e disinfezione, eseguendo tamponi ambientali da diverse superfici del capannone quali zone filtro, travi, abbeveratoi, tubature e ventilatori, con garze sterili inumidite. I tempi di campionamento sono riportati in Tabella 1. Al campionamento ambientale è stato associato un prelievo di penne dagli animali, se presenti al momento del campionamento. Sono stati selezionati in maniera casuale 5 animali per capannone campionandoli da tutta l’area del capannone da cui sono state prelevate penne con calami ricchi di polpa.

Tabella 1. Campionamenti ambientali eseguiti nella fase di pulcinaia dell'allevamento di riproduttori pesanti.

Età al campionamento (settimane)	Cicli			
	I°	II°	III°	IV°
Post-pulizia, Pre-accasamento	-	✓	✓	✓
3	-	✓*	-	-
8	-	✓*	✓*	-
9	-	-	-	✓*
12	-	✓*	-	-
13	-	-	-	✓*
16	-	-	✓*	-
20	✓	-	-	-
Pre-pulizia	-	✓	-	-
- Campionamento non effettuato; ✓ Campionamento effettuato; * Prelievo di penne.				

Processazione del campione ed estrazione del DNA da polvere

La polvere (1 ± 0.09 g) è stata posta in una provetta conica da centrifuga da 15 ml, risospesa in 5ml di PBS sterile e centrifugata a 2500g per 15 minuti a +4°C. Il surnatante ottenuto è stato centrifugato una seconda volta utilizzando gli stessi parametri. Dopo la seconda centrifugazione, il surnatante è stato prelevato con una siringa e filtrato attraverso un filtro sterile per siringa da 0.45 µm. I tamponi ambientali sono stati processati immergendoli in 10 ml di PBS sterile per 1 ora a temperatura di refrigerazione prima di procedere alla doppia centrifugazione ed alla filtrazione come sopra descritto. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da 200µl di filtrato o da pool di 5 penne (prelevando la parte del calamo delle penne infissa nel follicolo), utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL).

PCR nested per GaHV-2

Allo scopo di aumentare la sensibilità di protocolli di PCR già descritti (Mescolini et al., 2016 e 2019a), nel presente lavoro è stato disegnato un protocollo di PCR nested che combina i precedenti e consente di amplificare il gene *meq* di GaHV-2. La prima PCR si avvale della coppia di primer EcoRQ for (5'-GGT GAT ATA AAG ACG ATA GTC ATG-3') e EcoR-Q rev (5'-CTC ATA CTT CGG AAC TCC TGG AG-3'), disegnati su regioni genomiche esterne al gene *meq* (Shamblin et al., 2004), la seconda PCR della coppia di primer interni: meq-F (5'-ATG TCT CAG GAG CCA GAG CCG-3') e meq-R (5'-GGG TCT CCC GTC ACC TGG-3') (Hassanin et al., 2013).

Sequenziamento ed analisi di sequenza del gene meq di GaHV-2

I prodotti dell'amplificazione sono stati purificati usando ExoSAP-IT *Express* PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) e successivamente sequenziati (Macrogen, Madrid, Spain). Mediante il software Bioedit Sequence Alignment Editor le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate, allineate e confrontate con sequenze del gene *meq* di ceppi GaHV-2 di riferimento a patotipo noto presenti nel database GenBank, e con sequenze di ceppi rilevati in corso di focolai di MD in Italia (Mescolini *et al.*, 2019a e 2019b). Le sequenze amminoacidiche ottenute sono state analizzate per la ricerca di marker vaccinali e di virulenza (Mescolini *et al.*, 2019b). L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo Maximum Likelihood nel software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). I valori di bootstrap, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando ≥ 70 .

RISULTATI

Il 70% (28/40) dei gruppi di broiler campionati sono risultati positivi alla PCR nested per GaHV-2. Il 68% delle positività rilevate è risultato ascrivibile a GaHV-2 di origine vaccinale (CVI988/Rispens) sia all'analisi di sequenza che filogenetica. Il restante 32% delle positività è risultato ascrivibile a GaHV-2 di campo, aventi caratteristiche molecolari di elevata virulenza e sequenza del gene *meq* identica. Tali virus di campo sono stati evidenziati solo in tre allevamenti di cui due siti in Friuli-Venezia Giulia ed uno in Puglia.

I risultati dell'indagine svolta nell'allevamento di riproduttori sono riportati in Tabella 2. Il 100% dei campioni di polvere è risultato positivo per GaHV-2. Il 75% dei campioni è risultato positivo al solo virus di origine vaccinale (CVI988/Rispens), il 18% è risultato positivo al solo virus di campo, mentre il 7% è risultato positivo ad entrambi. Il 9% dei tamponi ambientali sono risultati positivi per GaHV-2, con il 75% delle positività ascrivibile a ceppo di campo ed il 25% a ceppo di origine vaccinale. All'analisi di sequenza i ceppi di campo presentavano sequenza del gene *meq* identica, con caratteristiche molecolari di elevata virulenza.

All'analisi filogenetica i ceppi di campo rilevati sia nei broiler che nei riproduttori rientravano all'interno di un unico cluster contenente ceppi rilevati, negli ultimi cinque anni, in corso di focolai di MD acuta in allevamenti industriali e rurali Italiani (Figura 1). I ceppi che all'analisi di sequenza risultavano di origine vaccinale rientravano tutti in un unico cluster contenente il ceppo vaccinale CVI988/Rispens.



Figura 1. Albero filogenetico basato sulla sequenza aa del gene *meq* di ceppi di riferimento a patotipo noto, ceppi di campo rilevati in corso di focolai di MD in Italia (Mescolini et al., 2019a e 2019b) e dei ceppi rilevati nelle polveri di allevamenti di broiler (p) e riproduttori pesanti (●) nel presente studio.

Tabella 2. Positività alla PCR nested per GaHV-2 nell'allevamento di riproduttori pesanti.

Età al campionamento (settimane)	Cicli						
	I°	II°		III°		IV°	
	Polvere	Polvere/ tamponi	Penne	Polvere/ tamponi	Penne	Polvere/ tamponi	Penne
Post-Pulizia	-	4/20 *	-	0/15	-	0/10	-
3	-	4/4	5/5 *	-	-	-	-
8	-	5/5	4/5	5/5	5/5	-	-
9	-	-	-	-	-	5/5	4/5*
12	-	5/5	5/5 *	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	5/5*	3/5
16	-	-	-	5/5 *	3/5 *	-	-
20	5/5 *	-	-	-	-	-	-
Pre-pulizia	-	5/5 *	-	-	-	-	-

- Campionamento non effettuato;

n/n n. positivi/n. campionati;

* Almeno un campione positivo al ceppo di campo.

DISCUSSIONE

In questo studio è stata valutata la circolazione di GaHV-2 in gruppi di broiler Italiani tramite analisi molecolari su polvere ambientale prelevata a fine ciclo produttivo. Più dei due terzi delle positività per GaHV-2 riscontrate erano ascrivibili al ceppo vaccinale CVI988/Rispens mentre le restanti positività erano ascrivibili a ceppi di GaHV-2 aventi caratteristiche molecolari di elevata virulenza e geneticamente identici tra loro. La circolazione di virus di campo ed elevata virulenza nell'allevamento del broiler conferma la necessità, in Italia, di vaccinare per la MD anche questa categoria produttiva. Per garantire la protezione nei riguardi di forme cliniche da virus ad elevata virulenza la recente letteratura (Gimeno, 2008; Gimeno et al., 2015) suggerisce l'impiego della associazione vaccinale CVI988/Rispens + HVT, al solo vaccino HVT. Ciò è valido a maggior ragione nei gruppi di broiler allevati con metodo biologico, che prevede tempi di allevamento prolungati e restrizioni nell'impiego dei detergenti e disinfettanti.

In secondo luogo è stata valutata la persistenza ambientale del GaHV-2 monitorando 4 cicli produttivi successivi di un allevamento di riproduttori pesanti in fase pollastra. Nonostante siano state applicate alla fine di ogni ciclo procedure di pulizia e disinfezione estreme, che prevedevano tra l'altro la flambatura delle superfici, in tutti i cicli consecutivi monitorati è stato rilevato persistentemente un ceppo di campo ed elevata virulenza. Grazie alle analisi molecolari eseguite in parallelo

su penne, è stato possibile osservare come nel tempo il momento dell'infezione degli animali con il ceppo di campo sia stato posticipato da 3 settimane di età (II ciclo produttivo) a 9-16 settimane di età (III e IV ciclo produttivo). Nelle polveri e nelle penne raccolte nel IV ciclo produttivo, ceppi di campo e vaccinali sono stati evidenziati assieme nello stesso campione. Ciò suggerisce una ridotta circolazione del ceppo di campo. La riduzione della carica virale ambientale, che ha di conseguenza reso più difficoltoso il raggiungimento della dose infettante minima per gli animali, può essere ragionevolmente imputata ad un incremento progressivo della efficacia delle misure di pulizia e disinfezione rigorosamente applicate. L'efficacia delle suddette procedure è avvalorata dall'esito negativo delle analisi molecolari effettuate alla fine del III e IV ciclo produttivo post-pulizia e disinfezione (tamponi ambientali). Questi risultati indicano l'assenza nei cicli suddetti del virus all'accasamento degli animali. La successiva positivizzazione potrebbe essere attribuita ad una nuova introduzione del virus o alla sua persistenza non rivelata con il protocollo di campionamento utilizzato. Importante sottolineare che parte del personale operante nella pulcinaia non è dedicato, ma opera anche negli relativi allevamenti di riproduzione, in cui si erano verificati focolai di MD in forma viscerale.

CONCLUSIONI

Le analisi molecolari svolte nel presente studio hanno evidenziato come in gruppi italiani di broiler e riproduttori pesanti vaccinati circolino ceppi di GaHV-2 con caratteristiche molecolari di elevata virulenza, possibile causa di forme cliniche, confermando che i vaccini attualmente in commercio non sono in grado di impedire l'infezione e la eliminazione virale. Rimane quindi di capitale importanza l'applicazione di protocolli di pulizia e disinfezione efficaci e rigorosi per controllare, e possibilmente azzerare, la pressione infettiva ambientale, e di stringenti misure di biosicurezza per evitare la reintroduzione.

BIBLIOGRAFIA

1. Carrozza JH, Fredrickson TN, Prince RP and RE Luginbuhl. (1973). Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease. *Avian Dis.* 17: 767-781.
2. Gimeno IM. (2008) Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine* 26 Suppl 3:C31-41.
3. Gimeno IM, Cortes AL, Faiz NM, Barbosa T and T Villalobos. (2015). Evaluation of Factors Influencing Efficacy of Vaccine Strain CVI988 Against Marek's Disease in Meat-Type Chickens. *Avian Dis.* 59:400-409.
4. Hassanin O, Abdallah F and IE El-Araby. (2013). Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Marek's Disease Virus from Clinical Cases of Marek's Disease in Egypt. *Avian Dis.* 57: 555-561.
5. Jurajda V and B Klimes. (1970) Presence and survival of Marek's disease agent in dust. *Avian Dis.* 14:188-190.
6. Kennedy DA, Cairns C, Jones MJ, Bell AS, Salathé RM, Baigent SJ, Nair VK, Dunn PA and AF Read. (2017) Industry-Wide Surveillance of Marek's Disease Virus on Commercial Poultry Farms. *Avian Dis.* 61:153-164.
7. Mescolini G, Lupini C, Bellinati L, Felice V, Listorti V, Massi P, Tosi G, Rossi

- G, Pesente P, Cecchinato M and E Catelli. (2016). Epidemiologia molecolare del virus della Malattia di Marek in Italia nel 2014-2016. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2016. Tavola Rotonda SIPA. Parma, 23 settembre 2016. pp 205-217.
8. Mescolini G, Lupini C, Felice V, Guerrini A, Silveira F, Cecchinato M and E Catelli. (2019a). Molecular characterization of the meq gene of Marek's disease viruses detected in unvaccinated backyard chickens reveals the circulation of low- and high-virulence strains. *Poult Sci.* 98: 3130-3137.
 9. Mescolini G, Lupini C, Davidson I, Massi P, Tosi G and E Catelli. (2019b). Marek's disease viruses circulating in commercial poultry in Italy in the years 2015-2018 are closely related by their meq gene phylogeny. *Transbound Emerg Dis.* [Epub ahead of print]
 10. Read AF, Baigent SJ, Powers C, Kgosana LB, Blackwell L, Smith LP, Kennedy DA, Walkden-Brown SW and VK Nair. (2015) Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. *PLOS Biology* 13: e1002198.
 11. Schat KA and V Nair. (2013). Marek's disease. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, and V Nair (Eds.), *Diseases of Poultry* 13th edn, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, pp.515-552.
 12. Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL and MS Parcels. (2004). Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: Association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Vet. Microbiol.* 102, 147-167.

EFFETTI DELL'AGGIUNTA DI PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI SULLE PERFORMANCE E SULLE CARATTERISTICHE DELLE UOVA DI GALLINE OVAIOLE ALIMENTATE CON MANGIMI A DIFFERENTI DENSITA' DI NUTRIENTI

Mikulski D.¹, Jankowski J.¹, Mikulska M.¹, Ligabue M.² and Demey V.²

¹ *Department of Poultry Science, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn, Poland -*

² *Lallemand SAS, 19 rue Briquetiers, BP 59, 31702 Blagnac, France*

Introduzione

Tra le soluzioni per ridurre l'uso di antibiotici nell'alimentazione del pollame, i probiotici rappresentano una valida alternativa in quanto non contribuiscono alla diffusione di geni di resistenza antimicrobica e appartengono a specie microbiche che garantiscono un impiego in sicurezza. Sebbene l'efficacia dei probiotici si basi sul ceppo o sui ceppi selezionati, sulla dose e sulla modalità di applicazione, sulla capacità di rimanere metabolicamente attivi lungo il tratto intestinale, sull'età degli uccelli e sui fattori di stress ambientale, ci sono ancora dibattiti sul livello di interazione che il probiotico può avere con la dieta. Il probiotico consumerà alcuni nutrienti dietetici per la propria crescita e la densità energetica della dieta condizionerà anche le performance degli uccelli (Montzouris et al, 2010). nelle galline ovaiole sono disponibili limitate evidenze di questa possibile interazione (Zhang e Kim, 2013; Mikulski et al, 2012). Pertanto, l'obiettivo di questo studio era di determinare l'effetto di un batterio probiotico sulle performance produttive e sulla qualità delle uova nelle galline ovaiole alimentate con diete variabili in termini di densità energetica e di nutrienti.

MATERIALI E METODI

Animali

Sono state arruolate nello studio duecento galline Hy-Line Brown di 31 settimane di età, dello stesso peso corporeo (BW) e appartenenti allo stesso lotto. Gli animali erano stati precedentemente vaccinati contro la bronchite infettiva, pseudopeste aviaria e sindrome del calo della deposizione. Ogni gruppo sperimentale era composto da 50 galline ovaiole alloggiare in gabbie individuali distribuite su tre livelli (40 x 35 x 60 cm, con una pendenza del pavimento di 12°). I gruppi sono stati equamente distribuiti per ridurre al minimo l'effetto delle diverse altezze delle gabbie. Ogni gabbia era dotata di un singolo abbeveratoio a tettarella. Ciascuna mangiatoia era ben isolata dalla gabbia contigua ed era riempita manualmente ogni giorno tramite sacchetti contrassegnati in modo univoco. Ciascuna gabbia era munita del proprio raccoglitore di uova in rete metallica per impedire l'accidentale mescolamento di uova provenienti da gruppi diversi. Tutte le galline erano alloggiare in un locale privo di finestre, dotato di un controllo ambientale della temperatura a 20-22 °C e munito di luce artificiale impostata a 16 ore consecutive di luce e 8 ore di buio.

Trattamenti sperimentali e diete

Per valutare le performance produttive ed i parametri qualitativi delle uova è stato utilizzato un disegno fattoriale 2 × 2 completamente randomizzato basato su due

diete, di cui una a media densità energetica e nutrizionale e l'altra a bassa densità energetica e nutrizionale (2.650 e 2.550 kcal ME/kg, MND e LND, rispettivamente). All'interno di ciascuna dieta un sottogruppo rappresentava il controllo mentre un'altro è stato trattato con il probiotico (0 e 100 g / t, P- e P+, rispettivamente).

L'olio di soia è stato integrato come fonte aggiuntiva di energia e per regolare il contenuto di ME (Energia Metabolizzabile) nelle diete. Entrambe le diete sono state formulate per avere un contenuto di energia (kcal/kg) inferiore alle raccomandazioni NRC [1994], stabilendo il livello di 2.650 kcal / kg come un livello ME tipico di gamma inferiore per le galline di questa fascia di età, con un consumo previsto fino a 110 g / d. Le diete MND e LND contenevano rispettivamente il 41% e il 46% di grano, il 20% e il 20% di mais, il 10% e il 7,8% di farina di soia, il 3% e lo 0,7% di olio di soia. La densità energetica effettiva della dieta dopo l'analisi è stata determinata secondo l'equazione di Fisher e McNab (1987) e mostrata tra parentesi nella tabella 1: $ME (MJ / kg) = (0,155 \times \% \text{ proteina grezza}) + (0,343 \times \% \text{ grassi}) + (0,167 \times \% \text{ amido}) + (0,130 \times \% \text{ zuccheri})$. Il probiotico oggetto della prova studio è stato il batterio lattico *Pediococcus acidilactici* ceppo MA18/5M (Bactocell PA 10[®], Lallemand SAS, Francia) aggiunto nel mangime a $1,0 \times 10^9$ CFU/kg. Le diete e l'acqua sono state fornite ad libitum. La prova è durata 16 settimane.

Tabella 1: Contenuto di nutrienti nella dieta basale (g/kg, come dieta base)

	MND	LND
Contenuto di nutrienti calcolato		
ME, kcal/kg ^{2,3}	2.650 (2.631)	2.550 (2.534)
Fosforo disponibile	3,90	3,80
Sodio	1,60	1,50
Contenuto di nutrienti analizzato ²		
Proteine grezze	168,0	163,8
Grassi grezzi	39,8	21,6
Amido	391,9	410,1
Zuccheri	38,2	36,6
Calcio	38,6	36,9
Fosforo	7,22	6,89

Rilievi

Le uova sono state raccolte quotidianamente e la produzione di uova è stata espressa come rapporto gallina/giorno (% gallina) per intervalli di quattro settimane. I pesi individuali delle uova sono stati registrati pesando singolarmente 2 uova per una gabbia (rappresentativa di 1 gallina) ogni 2 settimane e sono stati utilizzati per calcolare il peso medio delle uova a intervalli di quattro settimane. La massa totale delle uova è stata calcolata moltiplicando il peso medio delle uova per la produzione di uova. La qualità delle uova e del guscio (peso del guscio, spessore del guscio, colore del tuorlo, peso dell'albume e indice di Haugh dell'albume) è stata valutata a 35 settimane di età e poi a intervalli di 4 settimane.

L'assunzione di mangime è stata misurata per ogni gabbia ogni 4 settimane. L'assunzione giornaliera di ME è stata calcolata utilizzando il DFI (Daily Feed Intake – Consumo giornaliero di mangime) registrato e il contenuto energetico dei mangimi. L'indice di conversione (kg di mangime/kg di uova) per ciascun periodo è stato calcolato per ogni

gabbia sulla base della produzione di uova, peso delle uova e consumo di mangime. È stata inoltre calcolata la differenza tra l'assunzione giornaliera di ME e i fabbisogni teorici di ME (delta ME). Le galline sono state pesate all'inizio e alla fine dello studio.

Analisi statistiche

Gli effetti dell'integrazione del probiotico e le sue interazioni con il tipo di dieta (MND e LND) durante il periodo sperimentale sono stati determinati usando il modello ANOVA per misure ripetute. I tempi di ovodeposizione sono stati utilizzati come fattore delle misure ripetute (quattro periodi di 4 settimane) per la valutazione delle performance. La gabbia (gallina) è stata impostata come unità sperimentale.

RISULTATI

Come previsto, la densità energetica della dieta ha avuto un effetto significativo sull'assunzione di ME, poiché le galline alimentate con MND hanno consumato più calorie rispetto a quelle alimentate con diete LND (314 contro 304 kcal/gallina/giorno). I bassi livelli di energia nella dieta hanno ridotto significativamente il peso (di 1,6 g) e la massa dell'uovo (di circa 40 g) ed hanno contribuito ad un aumento dell'ICA (Tabella 3).

L'integrazione con probiotici ha aumentato significativamente il peso (+ 1,3%) e la massa delle uova (+ 1,9%), ha migliorato in modo significativo l'indice di conversione (1,97 contro 2,01 kg di mangime/kg di uova) e ha portato ad un aumento del tasso di deposizione (97,1 vs 96,3%) (Tabella 3).

Parametro	MND		LND		SEM	Dieta (D)		Probiotico (P)		P-value	
	P-	P+	P-	P+		MND	LND	P-	P+	D	P
Produzione uova (%)	96,25	96,86	96,28	97,42	0,168	96,56	96,85	96,27	97,14	0,507	0,053
Peso uovo (g)	62,91	63,74	61,35	62,08	0,132	63,32	61,72	62,13	62,91	<0,001	0,015
Produzione massa uova (kg)	1,693	1,724	1,656	1,688	0,005	1,709	1,672	1,675	1,706	0,015	0,038
Dose EM giornaliera (kcal/gallina)	313	314	306	302	0,914	314	304	310	308	<0,001	0,478
Consumo giornaliero mangime (g/gallina)	118,3	118,5	120,0	118,4	0,346	118,4	119,2	119,2	118,5	0,380	0,466
ICA (g mangime/g uova)	1,982	1,958	2,043	1,975	0,007	1,970	2,009	2,012	1,966	0,028	0,010
Peso corporeo iniziale (kg)	1,936	1,944	1,949	1,936	0,011	1,940	1,942	1,943	1,940	0,910	0,891
Peso corporeo finale (kg)	1,908	1,909	1,829	1,841	0,011	1,908	1,835	1,869	1,875	<0,001	0,518
Variazione peso corporeo (%) ³	1,55	2,01	6,76	5,39	0,429	1,77	6,08	4,13	3,70	<0,001	0,575

Tabella 3: Effetti della densità dei nutrienti e dell'integrazione di probiotici dietetici sulle performance di deposizione durante un periodo di alimentazione di 16 settimane

Il peso corporeo delle galline ed il consumo di mangime non sono stati influenzati dalla integrazione di probiotico nella dieta.

Per quanto riguarda la qualità delle uova, le ovaiole alimentate con diete arricchite con probiotico hanno prodotto uova con uno spessore maggiore del guscio ($P < 0,002$) e con un peso maggiore ($P < 0,008$) rispetto a quelle alimentate con diete senza integrazione di probiotico. I cambiamenti desiderabili nello spessore e nel peso del guscio d'uovo sono stati accompagnati da una diminuzione della percentuale di albume ($P = 0,043$), senza cambiamenti nella percentuale di tuorlo (Tabella 2).

DISCUSSIONE

L'assenza di una compensazione nel consumo di mangime non era atteso per la dieta a bassa densità energetica. Sebbene entrambi i livelli di assunzione di ME fossero inferiori alla raccomandazione NRC (1994) (335 kcal / gallina / giorno), l'assunzione di mangime effettiva è stata di circa 8 g al di sopra delle tabelle specifiche per linea genetica ed età (Hy-Line 2018) in tutti i gruppi. La maggiore perdita di peso delle galline LND supporta l'ipotesi di una compensazione metabolica della carenza di nutrienti attraverso la mobilitazione delle riserve corporee. Non è stata osservata alcuna interazione tra il probiotico e la densità energetica dei mangimi impiegati. Questo risultato conferma l'ipotesi di Zhang e Kim (2013), nonostante su questo argomento siano disponibili pochi riferimenti nel pollame.

Il gruppo alimentato con probiotico ha migliorato le performance di deposizione (uova più pesanti, maggiore e più efficiente produzione di massa dell'uovo e una forte tendenza a un tasso di deposizione più elevato) in linea con le conclusioni dei lavori precedenti (Mikulski et al., 2012; Quarantelli et al., 2008). Il guscio d'uovo più spesso del gruppo P+ può trovare una spiegazione nel maggiore assorbimento del calcio proposto da Mikulski et al. (2012). Questi risultati suggeriscono un maggiore utilizzo di energia da parte delle ovaiole alimentate con probiotici quando associati ai dati relativi ad una perdita di peso e ad un'assunzione di ME inferiori rispetto ai controlli.

Tabella 2: Effetti dei livelli di energia e densità dei nutrienti e integrazione di probiotici dietetici sulla qualità delle uova nelle galline ovaiole durante un periodo di alimentazione di 16 settimane.

Parametri	Spessore guscio (mm 10^{-2})	Peso relativo tuorlo (%)	Peso relativo guscio (%)	Peso relativo albume (%)
Densità nutrienti				
MND	0,361	25,34	10,59	64,07
LND	0,358	25,49	10,42	64,09
Probiotico				
P-	0,357	25,29	10,38	64,33
P+	0,363	25,53	10,64	63,83
P - value				
Densità nutrienti (ND)	0,114	0,452	0,082	0,938
Probiotico (P)	0,002	0,242	0,008	0,043

Conclusioni

L'integrazione dietetica con il probiotico a base di *P. acidilactici* ha avuto un effetto positivo sulle performance produttive delle galline ovaiole e sulla qualità delle uova

aumentandone il peso, la produzione della massa e lo spessore del guscio durante un periodo di deposizione di 16 settimane. Non è stata osservata alcuna interazione tra *P. acidilactici* e la densità energetica dei mangimi impiegati.

1. Fisher, C., and J. M. McNab. 1987. Techniques for determining the ME content of poultry feeds. In: Haresign W., and Cole D.J.A. (eds). Recent Advances in Animal Nutrition Butterworths, London: pp. 3-17.
2. Mikulski, D., Jankowski, J., Naczmanski, J., Mikulska, M., and V., Demey. 2012. Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens, Poult. Sci. 91, 2691–2700.
3. Mountzouris, K., Tsitrsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G., and K. Fegeros. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poult. Sci. 89: 58–67
4. Quarantelli A, Righi F, Agazzi A, Invernizzi G, Ferroni M, Chevaux E (2008). Effects of the administration of *Pediococcus acidilactici* to laying hens on productive performance. Vet. Res. Commun. 32: S359-361.
5. Zhang Z. F. and Kim I. H. 2013. Effects of probiotic supplementation in different energy and nutrient density diets on performance, egg quality, excreta microflora, excreta noxious gas emission, and serum cholesterol concentrations in laying hens. J. Anim. Sci. 91: 4781–47



VALUTAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI*, ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE ANTIBIOTIC FREE, BIOLOGICI E AL MACELLO

Musa L., Casagrande Proietti P., Bellucci S., Branciarri R., Menchetti L., Roila R., Giannone A., Franciosini M.P.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Via S. Costanzo, 4, 06126 Perugia PG

Summary

This work is aimed at evaluating the spread of *E.coli* strains, resistant to several antimicrobials on the basis of different rearing systems, common in Central Italy, such as organic and antibiotic-free, and on the basis of type and time of samplings (T1 at one day; T2 at 30d; T3 at slaughter). Mac Conkey agar and biochemical tests were used for isolation and identification of *E.coli* respectively. To identify and to confirm Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) *E.coli*, Mac Conkey agar with a low concentration of cefotaxime and Cefpodoxime Combination Disc Test (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI) were used respectively. The antimicrobial susceptibility was evaluated, using disk diffusion following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Regardless of the rearing system, the type and sampling times, high levels of resistance against tetracycline TE, (85.6%), ampicillin AMP (66.4%) and nalidixic acid NA (60%) were observed in all of the *E.coli* isolates. In relation to the sampling times, a decrease of *E. coli* resistant strains was detected from T1 to T3 to: AMP (from 77% to 47%, $P = 0.002$), ceftazidime (CAZ) (from 31% at 2%, $P < 0.001$), cefotaxime (CTX) (from 67% to 10% $P < 0.001$), amoxicillin/ clavulanic acid (AMC) (from 36% to 4%, $P < 0.001$), and TE (95% to 71%, $P < 0.001$) As regards the type of samples, the cloacal and environmental ones presented the highest number of *E. coli* resistant to AMP, CTX, AMC, NA, SXT and TE when compared to the samples collected at slaughter. The preliminary data are encouraging especially those related to a *E.coli* resistant strain decrease in samples collected along the production cycle and at the slaughter, likely due to the application of protocols, using antimicrobials only if necessary. Finally, a control aimed at evaluating the antimicrobial susceptibility of the microbiota of grandparents is recommended since they play a determinant role in vertically transmitting resistance genes as evidenced by the high number of resistant *E.coli* strains isolated in cloacal swabs at one day.

INTRODUZIONE

La resistenza agli agenti antimicrobici (AMR) negli animali di interesse zootecnico è un problema che riveste una importanza globale in Sanità pubblica. *E. coli* è conosciuto essere tra le specie batteriche dove più rapidamente, nel corso degli anni, si è verificata la selezione di geni di resistenza a seguito dell'uso di antimicrobici (Tadesse et al., 2012). Tale microrganismo, a causa della sua elevata diffusione, è considerato un indicatore della antibiotico resistenza delle popolazioni di gram negativi e un modello per lo studio di AMR (Kaesbohrer et al., 2012). Di particolare interesse in tale ambito è il riscontro di isolati di *E.coli* multiresistenti e ESBL di cui le specie avicole, in particolare pollo e tacchino, sono considerate una importante fonte di contamina-

zione per l'uomo (De Been et al., 2014; Falgenhauer et al., 2018). L'uso indiscriminato di antibiotici nel settore avicolo ha contribuito infatti a creare l'aumento progressivo di *E.coli* resistenti alla maggiori classi di antibiotici quali chinoloni, tetracicline e beta lattamici (Van den Bogaard et al., 2000; Hricovà et al., 2017). I geni responsabili della resistenza sono, inoltre, frequentemente localizzati a carico di elementi genetici trasferibili come plasmidi, pertanto *E. coli* può facilmente ricevere e trasmettere geni di resistenza antimicrobica ad altri batteri del microbiota intestinale tramite coniugazione (Carattoli et al., 2008 ;Bailey et al., 2010; Laxminarayan et al., 2013). L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare in allevamenti, biologici e antibiotic-free, comuni nel centro Italia , le diffusione di ceppi di *E.coli* resistenti a diversi antibiotici in base al tipo e ai tempi del campionamento.

MATERIALI E METODI

Campionamento I campionamenti sono stati effettuati in gruppi di polli da carne broiler (Ross 308) di consistenza numerica pari a 4600/5000 capi , allevati con sistema biologico e antibiotic-free. In questo ultimo caso i soggetti sono cresciuti in ambiente condizionato, seguendo il management dell'allevamento convenzionale (piani di vaccinazione, alimentazione) tranne che per l'uso di antimicrobici. I prelievi consistenti in tamponi cloacali e campioni ambientali (mangiatoie, abbeveratoio, lettiera) sono stati raccolti in allevamento a T1 (immissione) e a T2 (a 30 gg). Al macello (T3) sono stati prelevati individualmente dalle carcasse il contenuto cecale e la pelle del collo, quindi i campioni sono stati mantenuti a temperature di refrigerazione di 4°C fino all'arrivo in laboratorio

Isolamento e Identificazione di *E.coli* . Per l'isolamento di *E.coli* i campioni posti in terreno di prearricchimento costituito da acqua peptonata tamponata (BPW) in rapporto 1:10 sono stati incubati a 37°C per 18-24 ore in aerobiosi. Da ciascun campione così diluito è stata prelevato 0.1 ml di soluzione e quindi seminato su agar Mac Conkey , incubato per 24 h a 37 °C in anaerobiosi . Le colonie con una morfologia tipica, riferibile a *E. coli* sono state confermate mediante appropriate prove biochimiche. Per l'identificazione di ceppi ESBL, gli isolati sono stati seminati su agar Mac Conkey , addizionato con basse concentrazioni (1mg/L) di cefotaxime, messo a incubare a 37 ± 1°C per 18-24 h in condizioni di aerobiosi. I ceppi cresciuti sono stati testati per la conferma della produzione di ESBL mediante il test di combinazione con cefpodoxime da solo e associato con acido clavulanico (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI)

Test di suscettibilità agli antibiotici . Per valutare la suscettibilità agli antimicrobici, è stato utilizzato il test di diffusione su agar contenente diversi antibiotici a determinate concentrazioni: ampicillina (AMP) (10µg), cefotaxime (CTX) (30µg), ceftazidime (CAZ)(30µg), amoxicillina+acido clavulanico (AMC)(30µg), acido nalidixico (NA) (30µg),ciprofloxacina (CIP) (5µg), trimetoprim/sulfametoxazolo (SXT) (25µg), (TE) tetracicline (30µg), gentamicina (CN) (10µg).

Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. I risultati sono stati valutati secondo le linee guida di CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

Analisi statistiche Le proporzioni relative di campioni resistenti, intermedi e sensibili erano confrontate utilizzando i test chi-quadro o di Fisher. Le proporzioni di colonna erano confrontate con il test z utilizzando la correzione di Bonferroni. Per valutare l'effetto del tempo, del tipo di allevamento e del tipo di matrice sul numero di resisten-

ze era utilizzato un modello di regressione logistica ordinale. I risultati erano espressi come odds ratio (OR) con i corrispondenti intervalli di confidenza (CI) al 95% e P value. Un valore di $P < 0.05$ era considerato significativo. Le analisi erano realizzate utilizzando il software per le analisi statistiche SPSS versione 25.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

RISULTATI

Indipendentemente dalle caratteristiche di allevamento, dal tipo e dal tempo di campionamento è stato riscontrato un elevato numero di *E.coli* resistenti nei confronti di TE (85,6%), AMP (66,4%) e NA (60 %) (Tabella 1).

Tabella 1. Suscettibilità degli isolati di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici indipendentemente dal tempo, dall'allevamento e dal tipo di campione.

	Antibiotico	Conta	N %
AMP	Resistente	83	66.4%
	Sensibile	35	28.0%
	Intermedio	7	5.6%
CAZ	Resistente	14	11.2%
	Sensibile	110	88.0%
	Intermedio	1	0.8%
CTX	Resistente	34	27.2%
	Sensibile	83	66.4%
	Intermedio	8	6.4%
AMC	Resistente	19	15.2%
	Sensibile	86	68.8%
	Intermedio	20	16.0%
NA	Resistente	75	60.0%
	Sensibile	45	36.0%
	Intermedio	5	4.0%
CIP	Resistente	35	28.0%
	Sensibile	69	55.2%
	Intermedio	21	16.8%
SXT	Resistente	49	39.2%
	Sensibile	75	60.0%
	Intermedio	1	0.8%
TE	Resistente	107	85.6%
	Sensibile	17	13.6%
	Intermedio	1	0.8%
CN	Resistente	19	15.2%
	Sensibile	103	82.4%
	Intermedio	3	2.4%

Esaminando inoltre i pattern di resistenza si osserva che il 24,8%, il 23,2% , 26,4 % e 8% di *E.coli* mostrano rispettivamente resistenza nei confronti di 2, 3,4 e 5 antibiotici (Tabella 2).

Tabella 2. Pattern di resistenza degli isolati di *E. coli* osservati indipendentemente dal tempo, dall'allevamento e dal tipo di campione.

	Antibiotici	N degli isolati	N degli isolati (%)
0	-	5	4.0%
1	CN	1	0.8%
	B-lattamici	1	0.8%
	TE	15	12.0%
2	B-lattamici, TE	19	15.2%
	Chin, TE	10	8.0%
	SXT, TE	2	1.6%
3	B-lattamici, CN, TE	15	12.0%
	B-lattamici, SXT, TE	6	4.8%
	Chin, SXT, TE	3	2.4%
	Chin, TE, CN	5	4.0%
4	B-lattamici, Chin, SXT, TE	28	22.4%
	B-lattamici, Chin, TE, CN	4	3.2%
	B-lattamici, SXT, TE, CN	1	0.8%
5	B-lattamici, Chin, SXT, TE, CN	10	8.0%

B-lattamici (AMP, CAZ CTX,AMC); Chin (NA, CIP)

Paragonando la suscettibilità degli isolati in relazione alla tipologia di allevamento risulta che un maggior numero di *E.coli* resistenti a AMC è stato isolato negli allevamenti antibiotic free rispetto a quelli biologici (25.4 % vs 6.1 % , P<0,001) (Tabella 3).

Tabella 3. Suscettibilità di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici in relazione alla tipologia di allevamento

Antibiotico	Tipo					P
	Biologico		Antibiotic free		P	
	Conta	N %	Conta	N %		
AMP	Resistente	47	71.2%	36	61.0%	0.507
	Intermedio	3	4.5%	4	6.8%	
	Sensibile	16	24.2%	19	32.2%	
CAZ	Resistente	7	10.6%	7	11.9%	0.774
	Intermedio	0	0.0%	1	1.7%	
	Sensibile	59	89.4%	51	86.4%	
CTX	Resistente	17 _a	25.8%	17 _a	28.8%	0.045
	Intermedio	1 _a	1.5%	7 _b	11.9%	
	Sensibile	48 _a	72.7%	35 _a	59.3%	
AMC	Resistente	4 _a	6.1%	15 _b	25.4%	<0.001
	Intermedio	6 _a	9.1%	14 _b	23.7%	
	Sensibile	56 _a	84.8%	30 _b	50.8%	
NA	Resistente	35	53.0%	40	67.8%	0.146
	Intermedio	2	3.0%	3	5.1%	
	Sensibile	29	43.9%	16	27.1%	
CIP	Resistente	20	30.3%	15	25.4%	0.755
	Intermedio	10	15.2%	11	18.6%	
	Sensibile	36	54.5%	33	55.9%	
SXT	Resistente	23	34.8%	26	44.1%	0.359
	Intermedio	1	1.5%	0	0.0%	
	Sensibile	42	63.6%	33	55.9%	
TE	Resistente	56	84.8%	51	86.4%	0.604
	Intermedio	0	0.0%	1	1.7%	
	Sensibile	10	15.2%	7	11.9%	
CN	Resistente	14	21.2%	5	8.5%	0.100
	Intermedio	2	3.0%	1	1.7%	
	Sensibile	50	75.8%	53	89.8%	

I valori seguiti dalla stessa lettera in ogni riga non differiscono in modo significativo ($P < 0,5$; metodo di Bonferroni).

In relazione ai tempi di campionamento si evidenzia una diminuzione nel riscontro degli isolati resistenti di *E.coli* da T1 a T3 nei confronti di: AMP (dal 77% al 47%, P=0,002), CAZ (dal 31% al 2% , P<0,001), CTX (dal 67% al 10% P<0,001) e AMC (dal 36% al 4%, P <0,001), TE (95% al 71%, P<0,001) (Tabella 4) . Va sottolineato che solo nel caso di NA e SXT pur verificandosi una diminuzione di ceppi resistenti alla macellazione (41% e 24% rispettivamente) se paragonato a quelli presenti in T1 (62% e 31% rispettivamente) si osserva un aumento dei ceppi resistenti in T2 (86% e 71% rispettivamente) (Tabella 4).

Tabella 4. Suscettibilità di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici in relazione alla tempistica dei prelievi

Antibiotico		Tempo						P
		T1		T2		T3		
		Conta	N %	Conta	N %	Conta	N %	
AMP	Resistente	30 _a	77	29 _a	83	24 _b	47	0.002
	Intermedio	3 _a	8	1 _a	3	3 _a	6	
	Sensibile	6 _a	15	5 _a	14	24 _b	47	
CAZ	Resistente	12 _a	31	1 _b	3	1 _b	2	<0.001
	Intermedio	1 _a	3	0	0	0 _a	0	
	Sensibile	26 _a	67	34 _b	97	50 _b	98	
CTX	Resistente	26 _a	67	3 _b	9	5 _b	10	<0.001
	Intermedio	7 _a	18	1 _b	3	0 _b	0	
	Sensibile	6 _a	15	31 _b	89	46 _b	90	
AMC	Resistente	14 _a	36	3 _b	9	2 _b	4	<0.001
	Intermedio	7 _a	18	6 _a	17	7 _a	14	
	Sensibile	18 _a	46	26 _b	74	42 _b	82	
NA	Resistente	24 _a	62	30 _b	86	21 _a	41	0.001
	Intermedio	2 _a	5	0 _a	0	3 _a	6	
	Sensibile	13 _{a,b}	33	5 _b	14	27 _a	53	
CIP	Resistente	12	31	9	26	14	27	0.222
	Intermedio	6	15	10	29	5	10	
	Sensibile	21	54	16	46	32	63	
SXT	Resistente	12 _a	31	25 _b	71	12 _a	24	<0.001
	Intermedio	1 _a	3	0 _a	0	0 _a	0	
	Sensibile	26 _a	67	10 _b	29	39 _a	76	
TE	Resistente	37 _a	95	34 _a	97	36 _b	71	<0.001
	Intermedio	1 _a	3	0 _a	0	0 _a	0	
	Sensibile	1 _a	3	1 _a	3	15 _b	29	
CN	Resistente	6	15	8	23	5	10	0.196
	Intermedio	1	3	2	6	0	0	
	Sensibile	32	82	25	71	46	90	

I valori seguiti dalla stessa lettera in ogni riga non differiscono in modo significativo (P<0,05; metodo di Bonferroni).

Per quanto riguarda la tipologia del campione in linea generale i tamponi cloacali e ambientali hanno presentato il più alto numero di *E.coli* resistenti nei confronti di AMP, CTX, AMC,NA, SXT e TE se paragonati ai prelievi effettuati in sede di macellazione (Tabella 5). Nel caso di CIP il numero di *E.coli* resistenti a livello a cutaneo riscontrati alla macellazione è stato più alto di quello riferito al contenuto intestinale (37,5% vs 4,5%, P<0,001) (Tabella 5) . Sono stati isolati in totale 6 ceppi di *E.coli* ESBL, 4 dall'allevamento biologico e 2 da quelli antibiotic free , di questi solo 1 è stato isolato alla macellazione a livello di contenuto cecale proveniente da pollo biologico.

Tabella 5. Suscettibilità di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici in relazione alla tipo di campione

	Cloacale		Ambientale		Cecale		Cutaneo		P	
	Conta	N %	Conta	N %	Conta	N %	Conta	N %		
AMP	Resistente	45a	83.3%	15a,b	71.4%	11b	50.0%	9b	37.5%	<0.001
	Intermedio	2a	3.7%	2a	9.5%	0a	0.0%	3a	12.5%	
	Sensibile	7a	13.0%	4a,b	19.0%	11b	50.0%	12b	50.0%	
CAZ	Resistente	8	14.8%	5	23.8%	1	4.5%	0	0.0%	0.067
	Intermedio	1	1.9%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
	Sensibile	45	83.3%	16	76.2%	21	95.5%	24	100.0%	
CTX	Resistente	20a	37.0%	9a	42.9%	2a,b	9.1%	0b	0.0%	<0.001
	Intermedio	6a	11.1%	2a	9.5%	0a	0.0%	0a	0.0%	
	Sensibile	28a	51.9%	10a	47.6%	20b	90.9%	24b	100.0%	
AMC	Resistente	10a	18.5%	7a	33.3%	1a	4.5%	1a	4.2%	0.035
	Intermedio	9a	16.7%	5a	23.8%	4a	18.2%	2a	8.3%	
	Sensibile	35a,b	64.8%	9b	42.9%	17a,b	77.3%	21a	87.5%	
NA	Resistente	37a	68.5%	17a	81.0%	6b	27.3%	12a,b	50.0%	0.005
	Intermedio	2a	3.7%	0a	0.0%	2a	9.1%	1a	4.2%	
	Sensibile	15a	27.8%	4a	19.0%	14b	63.6%	11a,b	45.8%	
CIP	Resistente	9a,b	16.7%	13c	61.9%	1b	4.5%	9a,c	37.5%	<0.001
	Intermedio	12a	22.2%	4a	19.0%	3a	13.6%	2a	8.3%	
	Sensibile	33a	61.1%	4b	19.0%	18a	81.8%	13a,b	54.2%	
SXT	Resistente	27a	50.0%	10a	47.6%	4a	18.2%	5a	20.8%	0.007
	Intermedio	0a	0.0%	1a	4.8%	0a	0.0%	0a	0.0%	
	Sensibile	27a	50.0%	10a	47.6%	18a	81.8%	19a	79.2%	
TE	Resistente	51a	94.4%	21a,b	100.0%	16b,c	72.7%	17c	70.8%	0.001
	Intermedio	1a	1.9%	0a	0.0%	0a	0.0%	0a	0.0%	
	Sensibile	2a	3.7%	0a,b	0.0%	6b,c	27.3%	7c	29.2%	
CN	Resistente	10	18.5%	4	19.0%	1	4.5%	2	8.3%	0.430
	Intermedio	2	3.7%	1	4.8%	0	0.0%	0	0.0%	
	Sensibile	42	77.8%	16	76.2%	21	95.5%	22	91.7%	

I valori seguiti dalla stessa lettera in ogni riga non differiscono in modo significativo (P<0,05; metodo di Bonferroni).

DISCUSSIONE

Il nostro studio ha messo in evidenza la presenza di un numero elevato di ceppi resistenti a TE e AMP indipendentemente da tipologia di allevamento, natura e tempistica del prelievo ; un dato non del tutto sorprendente in relazione al fatto che questi antibiotici sono da tempo utilizzati in campo avicolo (Yassin et al, 2017). Dall'analisi dei pattern di resistenza risultano diffusi i ceppi caratterizzati da multiresistenza in conformità a ricerche effettuate da altri Autori (Dandachi et al., 2017; Davis et al., 2018). Nel nostro lavoro sono stati riscontrati più frequentemente ceppi di *E.coli* con resistenza multipla nei confronti di beta lattamici, ciprofloxacina , sulfametoxazolo associato a trimethoprim e tetracicline. Negli allevamenti antibiotic-free è stato evidenziato, in paragone agli allevamenti biologici, un numero significativamente più elevato di *E.coli* resistenti a amoxicillina e acido clavulanico, associazione utilizzata da tempo in medicina umana (Finlay et al., 2003) . Va ricordato che fluorochinoloni, macrolidi e beta lattamici seppure ammessi per l'uso in campo zootecnico sono considerati da WHO (2016) gli antibiotici più "critici" per il realizzarsi di fenomeni di antibiotico resistenza in umana . In relazione alla tempistica dei prelievi , indipendentemente dalla tipologia, viene osservato un verificarsi della diminuzioni di ceppi resistenti nei confronti della maggior parte di antibiotici testati quasi a sottolineare una possibile "clearance", favorita dall'assenza di trattamenti antimicrobici, che si attua a carico di una popolazione di *E.coli* , costituita perlopiù da ceppi resistenti ereditata alla nascita . Nilsson et al. (2014) hanno riportato la frequente presenza in riproduttori grandparent del gene *bla*_{CMY2} e il riscontro del clone di *E.coli* carrier di *bla*_{CMY-2} a tutti i livelli della produzione piramidale. Se consideriamo il grado di contaminazione in relazione alla natura dei campioni, i prelievi ambientali e i tamponi cloacali presentano un alto numero di ceppi resistenti, specialmente nei confronti delle tetracicline . Questa classe di antibiotici è forse la più "datata" in termini di uso in zootecnia e nonostante l'avvento di nuove molecole viene ancora impiegata, in particolare la doxiciclina, per il trattamento di forme respiratorie di natura batterica, spesso in alternativa ai chinoloni, in virtù degli elevati livelli di resistenza registrati nei confronti di questi ultimi (Endtz et al 1991; Hricová et al., 2017) A livello di macellazione si registra in linea generale una riduzione dei ceppi di *E.coli* resistenti , dovuta verosimilmente, nel caso di campioni cutanei al transito nel tunnel di refrigerazione che sicuramente può influenzare la carica batterica di superficie. Interessante è il risultato relativo al basso numero di *E.coli* resistenti riscontrati a carico dei campioni di contenuto cecale che supporta il riscontro della diminuzione dei ceppi resistenti verificatosi in tempi successivi .

CONCLUSIONI

I dati preliminari, pur confermando l'esistenza di una problematica che attualmente è definita una emergenza per la salute pubblica, risultano incoraggianti , soprattutto quelli riferiti a una diminuzione dei ceppi resistenti di *E.coli* in prelievi realizzati lungo il ciclo di produzione e alla macellazione . Ciò potrebbe essere giustificato dall'applicazione di protocolli aziendali in cui il ricorso all'antibiotico è previsto solo in caso di effettiva necessità . Viene sottolineata infine l'importanza di un controllo indirizzato a valutare la suscettibilità agli antibiotici del microbiota dei grandparents che si configurano tra i maggiori responsabili del fenomeno di antibiotico resistenza nella catena di produzione avicola come supportato dall'alto numero di *E.coli* resistenti nei tamponi cloacali isolati a 1 giorno di vita

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S e Hall R (2010). Commensal *Escherichia coli* of healthy humans - a reservoir for antibiotic resistance determinants. *J Med Microbiol* 59: 1331–1339.
2. Carattoli, A., (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 1: 117–123.
3. Dandachi I, Sokhn ES, Dahdouh AE, Azar E, El-Bazzal B, Rolain JM e Daoud Z. (2018). Prevalence and characterization of multi-drug-resistant Gram-negative Bacilli isolated from Lebanese poultry: A nationwide study. *Front Microbiol.* 9: 550
4. Davis GS, Waits K, Nordstrom L, Grande H, Weaver B, Papp K, Horwinski J, Koch B, Hungate BA, Liu CM e Price LB. (2018). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiology.* 174.
5. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Li N, Tooming-Klunderud A, Heederik DJ, Fluit AC, Bonten MJ, Willems RJ, de la Cruz F e van Schaik W. (2014). Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLOS Genet.* 10:e1004776.
6. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T e Mouton RP. (1991). Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother.* 27(2):199-208.
7. Falgenhauer L, Ghosh H, Guerra B, Yao Y, Fritzenwanker M, Fischer J, Helmuth R, Imirzalioglu C e Chakraborty T. (2017). Comparative genome analysis of IncHI2 VIM-1 carbapenemase-encoding plasmids of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from a livestock farm in Germany. *Vet Microbiol.* 200:114-117.
8. Finlay J, Miller L e Poupard JA. (2003). A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J Antimicrob Chemother.* 52: 18-23.
9. Hricová K, Röderová M, Pudová V, Hanulík V, Halová D, Julínková P, Dolejšká M, Papoušek I e Bardoň J. (2017). Quinolone-resistant *Escherichia coli* in poultry farming. *Cent. Eur. J. Public Health.* 25(2): 163-167.
10. Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen BA, Alt K, Guerra B e Appel B. (2012). Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses Public Health* 59, 158–165
11. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED e O Cars. (2013) Antibiotic resistance-the need for global solutions *Lancet Infect. Dis.* 13: 1057-1098
12. Nilsson O, Börjesson S, Landén A e Bengtsson B. (2014). Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(6):1497-500
13. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ e McDermott PF. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from hu-

- mans and food animals. *Emerg Infect Dis.* 18(5):741-9.
14. van den Bogaard AE e Stobberingh EE. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 14(4):327-35.
 15. WHO. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance . WHO, Geneva, Switzerland.
 16. Yassin AK, Gong J, Kelly P, Lu G, Guardabassi L, Wei L, Han X, Qiu H, Price S, Cheng D e Wang C. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PLoS One.* 12(9):e0185326.

PROFILO DI ESPRESSIONE DI CITOCCHINE INFIAMMATORIE NELLA MEMBRANA CORION ALLANTOIDEA DI EMBRIONI DI POLLO SPF: RISULTATI PRELIMINARI

Parigi M.^{1,3}, Massi P.¹, Tosi G.¹, Fiorentini L.¹, Turri V.²

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì, Via Don E. Servadei 3E/3F, 47122 Forlì;*

² *Istituto Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST), Via Maroncelli 40, 47014 Meldola;*

³ *Istituto Oncologico Romagnolo (IOR) Via A. Costa 28, 47122 Forlì*

ABSTRACT

Cytokines are triggering factors for the immunity response and inflammation. In literature, only few studies investigated the presence and the state of innate immune system in chicken embryos, focusing only on the whole embryo and not on the corion allantoic membrane (CAM). CAM is currently considered a robust experimental platform to study angiogenesis, cancer research and drug development. In this study, we demonstrated the expression patterns of innate immune genes of anti-inflammatory cytokines (IL-6, IFN α e IFN γ) in CAM collected from SPF chicken embryos of different age. Furthermore, we investigated the modification of these cytokines expression pattern following the inoculation in CAM of different inoculum, as Infectious Laringotracheitis Virus (ILTV), phosphate saline buffer (PBS) and a plant virus (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), which is under study as potential vector for oncolytic proteins. As expected ILTV induced the expression of IL-6, IFN α e IFN γ , whereas CaMV seemed to be related to a downregulation of the all the genes investigated. The biological significance of this latter result needs to be further investigated together with the expression pattern of more cytokines in order to obtain a detailed picture of the innate response of this extraembryonic membrane.

INTRODUZIONE

Le citochine sono considerati fattori chiave coinvolti nell'induzione della risposta immunitaria e dell'infiammazione; dal punto di vista biochimico sono un gruppo di mediatori in grado di andare ad agire su cellule specifiche e regolare di conseguenza i processi infiammatori e immunitari (Giansanti, Giardi, and Botti 2007). Nei pochi lavori presenti in letteratura in cui è stato indagato il profilo di espressione delle citochine durante lo sviluppo embrionale di pollo (Anastasiadou and Michailidis 2016; Meade et al. 2009), ci si è focalizzati sull'embrione nella fase iniziale dell'embriogenesi (entro i 10 giorni di età), analizzando l'embrione *in toto*. Non ci sono dati, invece, riguardo il profilo di espressione delle citochine nella membrana corion allantoidea (MCA), comparto extraembrionale che per le sue peculiari caratteristiche viene utilizzato come modello per studi di angiogenesi, di farmacocinetica, di tossicologia, oltre che poter ricevere il trapianto di cellule tumorali per studi preclinici di efficacia chemioterapica (Nowak-Sliwinska, Segura, and Iruela-Arispe 2014).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare il profilo di espressione di 5 citochine, 4 di cui pro-infiammatorie (IL-6, IL-1 β , IFN α , IFN γ) e una antiinfiammatoria (IL-10), a livello di membrana corion allantoidea (MCA) di embrioni *Specific Patho-*

gen Free (SPF) di diverse età in modo da verificare lo stato del sistema immunitario innato in un comparto extraembrionale.

Si è poi proceduto con l'analisi delle modificazioni dell'espressione genica in condizioni di inoculo sperimentale, quali inoculo di soluzione di salina antibiotata sterile (PBS), inoculo del virus della Laringotracheite Infettiva Aviaria (LTI) e inoculo di particelle di un virus di origine vegetale, oggetto di studio di un progetto scientifico dell'Istituto Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) in quanto vettore di proteine potenzialmente oncolitiche. L'inoculazione di questo virus vegetale ha avuto lo scopo di valutare la reazione da parte della membrana corion allantoidea di un potenziale corpo estraneo, incapace di integrarsi all'interno delle cellule, ma potenzialmente in grado di stimolare una risposta immunitaria.

MATERIALI E METODI

1. EMBRIONI SPF NON INOCULATI: RACCOLTA E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI DI MEMBRANA CORION ALLANTOIDEA (MCA)

I campioni analizzati in questo studio sono stati prelevati da uova embrionate di pollo SPF (Charles River Laboratories International, Inc.) incubate a 37.5°C al 65-75% di umidità relativa fino a 19 giorni. Per valutare e misurare l'espressione genica delle citochine nella MCA in corso di embriogenesi sono stati analizzati campioni prelevati da embrioni di diversa età, nello specifico di 10, 13, 16 e 19 giorni (n=5 embrioni per ogni età). Da ciascun embrione, soppresso mediante congelamento rapido a -20°C per almeno 30 minuti, è stata prelevata un'aliquota di MCA (peso in mg), omogenizzata, risospesa in 750 µL di QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen Ltd) e stoccata a -70°C fino all'estrazione dell'RNA totale, eseguita seguendo il protocollo della ditta produttrice. In seguito a quantificazione mediante spettrofotometro, 1µg di RNA è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit iScript™ cDNA (Bio-Rad). L'espressione quantitativa delle citochine è stata valutata mediante real-time PCR in un termociclatore Bio-Rad CFX96; la mix di reazione è stata preparata utilizzando il kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), 500nM di ciascun primer (Michailidis et al., (2014) per b-actina, IL-6, IL-10, IL-1b; Nang et al., (2011) per IFNα e IFNγ) in un volume finale di 20 µL utilizzando 1/10 del cDNA sintetizzato. I parametri termici prevedevano 95°C 30 sec, 40 cicli di denaturazione a 95°C per 5 sec e annealing/extension a 58°C per 10 sec, seguiti da una curva di Melt da 65°C a 95°C con lettura ogni 0.5°C per 5 sec per l'identificazione dei prodotti di PCR. Due controlli negativi sono stati inclusi in ogni reazione per monitorare la contaminazione di DNA genomico. I dati di real-time PCR sono stati analizzati mediante Software CFX Maestro™ (Bio-Rad) utilizzando il metodo 2^{-DDCt} così da ottenere il livello relativo di espressione di ogni citochina nei confronti della b-actina in ciascun campione. L'espressione dei geni target è stata normalizzata nei confronti dell'espressione rilevata negli embrioni SPF di 10 giorni di età. L'analisi e il confronto dell'espressione di ciascuna citochina nei 4 gruppi di età è stata eseguita mediante test ANOVA (one-way) utilizzando il Software CFX Maestro™ (Bio-Rad); i risultati sono stati espressi come media±SEM e la significatività statistica è stata considerata per valori di p< 0.05.

2. INOCULO SPERIMENTALE DI EMBRIONI E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI DI MCA

Per indagare le modificazioni di espressione delle citochine (IL-6, IL-10, IL-1b, IFNa e IFNg) in condizioni sperimentali, tre diversi inoculi sono stati preparati e inoculati in embrioni di 10 giorni di età (n=6 per gruppo, 0.2 mL di inoculo per uovo) in membrana corion-allantoidea. Nello specifico, nel primo gruppo è stata inoculata una soluzione di PBS antibiotato sterile, normalmente utilizzata come diluente di omogenati di organi da sottoporre ad esame virologico mentre nel secondo gruppo è stato utilizzato un ceppo di campo del Virus della Laringo Tracheite Infettiva Aviare. Il terzo gruppo è stato inoculato con 2 ug/uovo di virus Mosaico del Cavolfiore, virus a DNA, appartenente al gruppo dei Pararetrovirus, isolato e purificato dal Dipartimento di Patologia Vegetale della Scuola di Agraria dell'Università di Bologna.

Le uova sono state mantenute per 9 giorni post inoculazione (p.i) e sopresse mediante congelamento rapido a -20°C per almeno 30 minuti; da ciascun embrione a livello del punto di inoculo è stata prelevata un'aliquota di MCA, sminuzzata e stoccata a -70°C in 750 µL di QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen Ltd) fino all'estrazione dell'RNA totale eseguita seguendo il protocollo della ditta produttrice. La retrotrascrizione e l'espressione quantitativa delle citochine è stata valutata mediante real-time PCR seguendo le procedure descritte in precedenza. I dati di real-time PCR sono stati analizzati mediante Software CFX Maestro™ (Bio-Rad) utilizzando il metodo 2^{-DDCt} così da ottenere il livello relativo di espressione di ogni citochina nei confronti della b-actina in ciascun campione. In seguito all'interno di ciascun gruppo, l'espressione dei geni target è stata normalizzata nei confronti dell'espressione rilevata negli embrioni SPF di 19 giorni di età.

L'espressione di ciascuna citochina è stata confrontata nei 3 gruppi utilizzando il test ANOVA (one-way) ed i risultati sono stati espressi come media±SEM; la significatività statistica è stata considerata per valori di p< 0.05.

Alla fine del I° passaggio e all'interno di ciascun gruppo, la presenza di DNA virale di LTI e di CaMV da ciascun embrione è stata confermata mediante real-time PCR, utilizzando protocolli presenti in letteratura (Callison et al. 2007; Wolf et al. 2000).

RISULTATI

1. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI CITOCHINE IN EMBRIONI SPF DI DIVERSA ETÀ

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi per il gene della b-actina, indicando una corretta estrazione dell'RNA e retrotrascrizione a cDNA. Per quanto riguarda l'espressione delle citochine ricercate (IL-6, IL-10, IL-1b, IFNa, IFNg), tutti i campioni sono risultati negativi per IL-10, mentre per IL-1b non è stato possibile effettuare una valutazione dell'espressione a causa della mancanza di curve di Melt specifiche. Tutti i campioni analizzati alle diverse età sono risultati positivi per la presenza di mRNA di IL-6 e IFNa, mentre per IFNg sono risultati positivi solo i campioni di MCA prelevati da embrioni di 19 giorni.

Normalizzando il dato di espressione dei trascritti rispetto agli embrioni di 10 giorni di età, è stato osservato un aumento del livello di espressione di IFNa e di IL-6 all'aumentare dell'età, in particolare fino ad 8 volte per IFNa e 7 volte per IL-6 nelle MCA di 19 giorni (p<0.05, Fig.1)

2. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI CITOCHINE IN EMBRIONI INOCULATI

Nessun embrione è morto spontaneamente nei 9 giorni p.i. nei 3 gruppi inoculati. Inoltre in ciascun gruppo inoculato, tutti i campioni di MCA prelevati sono risultati positivi per la presenza di DNA virale di LTI e di CaMV; tutti i campioni inoculati con PBS antibiotato sono risultati negativi.

Come rilevato dall'analisi dei campioni prelevati da embrioni SPF, tutti i campioni analizzati alla fine del I° passaggio sono risultati positivi per il gene della b-actina, indice di una corretta estrazione dell'RNA e retrotrascrizione a cDNA. Di nuovo, tutti i campioni sono risultati negativi per IL-10, mentre per IL-1b non è stato possibile effettuare una valutazione dell'espressione a causa della mancanza di curve di Melt specifiche. Inoltre, nel gruppo inoculato con il PBS antibiotato non sono state identificate curve di Melt specifiche per l'IFN γ .

Dalla normalizzazione del livello di espressione delle citochine con il dato degli embrioni SPF, è stato osservato un aumento dell'espressione di IL-6, IFN α e IFN γ nelle MCA inoculate con il virus della LTI e una diminuzione della loro espressione nel gruppo di embrioni inoculati con virus CaMV (Fig. 2). Questa differenza rilevata nei 3 gruppi è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$).

DISCUSSIONE

Gli studi presenti in letteratura riguardo l'espressione genica di citochine infiammatorie sono molto esigui e riguardano solitamente l'embrione SPF *in toto* (Anastasiadou and Michailidis 2016; Bhanja et al. 2015; Meade et al. 2009). La membrana corion allantoidea, annesso importantissimo nello sviluppo embrionale e oggetto di interesse scientifico per la sua facile accessibilità, non era stata ancora studiata dal punto di vista della competenza immunitaria.

A tal proposito l'aver evidenziato un profilo di espressione di diverse citochine nelle MCA di embrioni SPF di diversa età è un dato nuovo e indicativo di come questo organo, seppur extraembrionale, abbia potenziali capacità di risposta immunitaria a fattori stressogeni esterni, soprattutto nelle fasi finali dell'embriogenesi. In particolare questo rilievo può essere interessante se consideriamo che, nel campo della ricerca oncologica, vengono impiegati test di valutazione dell'efficacia di protocolli chemioterapici che utilizzano proprio la MCA di embrioni di pollo di 9-10 giorni di età come sito di impianto di linee tumorali umane, primarie o continue. Quindi, il possibile instaurarsi di una risposta infiammatoria locale potrebbe condizionare, in positivo od in negativo, la buona riuscita degli esperimenti.

Il confronto tra i nostri dati e quelli pubblicati nei due lavori presenti in letteratura risulta difficile, in quanto il profilo di espressione genica ricercato e ritrovato risulta essere diverso e discordante (Anastasiadou and Michailidis 2016; Bhanja et al. 2015). Possiamo comunque affermare che a livello di MCA abbiamo riscontrato un incremento dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e di IFN α nelle MCA di 13,16, e 19 giorni di età rispetto ai 10 giorni.

Per quanto riguarda i 3 gruppi inoculati sperimentalmente, l'induzione dell'espressione di tutte e tre le citochine proinfiammatorie negli embrioni inoculati con il virus della LTI, rispetto agli embrioni SPF, è stato un rilievo atteso. Questo herpesvirus aviario trova infatti nella membrana corion allantoidea degli embrioni di pollo il sito di replicazione ideale, tanto che l'inoculo in MCA viene ancora oggi utilizzato per la produzione di vaccini vivi attenuati per LTI oltre che a livello diagnostico per l'isolamento virale. In particolare, abbiamo osservato un incremento nell'espressione

di IFN γ , mediatore chimico con nota attività antivirale (Giansanti et al. 2007), che già nel 1985 era stato rilevato da Krempien e collaboratori a livello embrionale in risposta ad infezione con il virus dell'influenza aviaria (Krempien, Redmann, and Jungwirth 2011).

La diminuita espressione, invece, dei geni codificanti per le 3 citochine evidenziata nel gruppo inoculato con virus CaMV, rispetto agli embrioni SPF, è un dato interessante che può essere spunto per alcune considerazioni. Il riscontro di DNA del virus CaMV in tutti i campioni analizzati e la significatività statistica dei risultati ci permettono di supporre che l'effetto osservato sia una conseguenza delle particelle virali inoculate. Si può infatti ipotizzare che il contatto con un antigene non di origine animale comporti la downregolazione della risposta infiammatoria e una conseguente diminuzione dell'espressione dei geni a livello di membrana. Tale diminuzione, inoltre, potrebbe essere mediata da qualche antigene proteico presente nel virione del CaMV in grado di silenziare l'espressione genica delle citochine ricercate.

CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo lavoro indicano la presenza di un profilo genico in grado di indurre risposta infiammatoria innata anche a livello di MCA. Considerando lo studio e l'utilizzo di questo comparto extraembrionale in diversi campi della ricerca scientifica risulta essere necessario aumentare il numero di citochine di cui indagare il profilo di espressione in modo da delineare un quadro più completo e utile in corso di inoculazioni sperimentali.

Inoltre, il significato biologico degli effetti indotti dal virus CaMV di origine vegetale deve essere sicuramente approfondito e integrato con la valutazione dei profili delle singole proteine del virione. Questi approfondimenti si rendono necessari soprattutto considerando l'interesse scientifico di questo virus nel campo della ricerca oncologica.

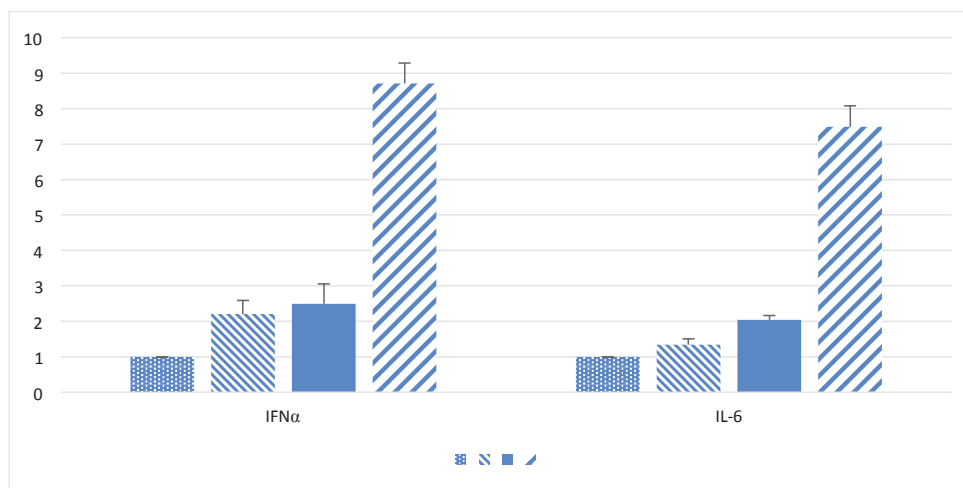


Fig.1: Embrioni SPF: espressione dei trascritti di mRNA di IFN α e IL-6 relativa agli embrioni SPF di 10 gg.

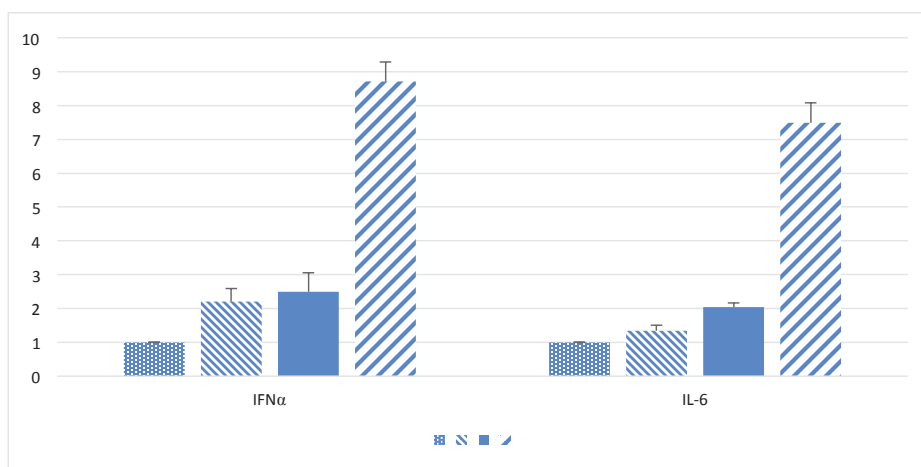


Fig.2: Embrioni inoculati: espressione dei trascritti di mRNA di IFN α , IL-6 e IFN γ relativa agli embrioni SPF di 19 gg.

BIBLIOGRAFIA

1. A., Papparini and Romano-Spica V. 2006. "Gene Transfer and Cauliflower Mosaic Virus Promoter 35S Activity in Mammalian Cells." *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 41(4 PG-437-49):437-49.
2. Anastasiadou, M. and G. Michailidis. 2016. "Research in Veterinary Science Cytokine Activation during Embryonic Development and in Hen Ovary and Vagina during Reproductive Age and Salmonella Infection." *YRVSC* 109:86-93.
3. Bhanja, Subrat K. et al. 2015. "In Ovo Administration of Silver Nanoparticles and/or Amino Acids Influence Metabolism and Immune Gene Expression in Chicken Embryos." *International Journal of Molecular Sciences* 16(5):9484-9503.
4. Callison, S. A. et al. 2007. "Development and Validation of a Real-Time Taqman® PCR Assay for the Detection and Quantitation of Infectious Laryngotracheitis Virus in Poultry." *Journal of Virological Methods* 139(1):31-38.
5. Giansanti, F., M. Giardi, and D. Botti. 2007. "Avian Cytokines - An Overview." *Current Pharmaceutical Design* 12(24):3083-99.
6. Krempien, U., Redmann, I. and Jungwirth, J. 2011. "Purification of Chick Interferon by Zinc Chelate Affinity Chromatography and Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Journal of Interferon Research* 5(1):209-14.
7. Meade, Kieran G., Rowan Higgs, Andrew T. Lloyd, Seamus Giles, and Cliona O'Farrelly. 2009. "Differential Antimicrobial Peptide Gene Expression Patterns during Early Chicken Embryological Development." *Developmental and Comparative Immunology* 33(4):516-24.
8. Nowak-Sliwinska, Patrycja, Tatiana Segura, and M. Luisa Iruela-Arispe. 2014. "The Chicken Chorioallantoic Membrane Model in Biology, Medicine and Bioengineering." *Angiogenesis* 17(4):779-804.
9. Wolf, Christian et al. 2000. "Detection of Cauliflower Mosaic Virus by the Polymerase Chain Reaction: Testing of Food Components for False-Positive 35S-Promoter Screening Results." *European Food Research and Technology* 210(5):367-72.

ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI CIRCOLANTI IN ITALIA

Quaglia G.¹, Mescolini G.¹, Catelli E.¹, Berto G.², Muccioli F.³, Lupini C.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)*

² *CEVA Salute Animale, Agrate Brianza (MB)*

³ *Medico Veterinario*

Summary

Chicken Infectious Anaemia Virus (CIAV), a member of the genus *Gyrovirus*, is the etiological agent of a disease affecting chicken, named chicken infectious anaemia. The virus infects bone marrow-derived cells, resulting in severe anaemia and immunosuppression in young chickens and compromised immune response in older birds. This study reports the molecular characterization of 25 CIAV strains detected in Italian chickens of different production types, from environmental dust, feathers or tissues. Virus genomes were amplified by a Nested-PCR protocol targeting a partial sequence of the VP1 protein. Sequence and phylogenetic analysis showed that strains had heterogenic sequences clustering into genogroups II, IIIa, and IIIb, and possess aminoacidic residues peculiar of virulent strains. Only one CIAV strain had sequence very close to the vaccine strain (26P4) and could be classified as a vaccine-derived strain.

Viral DNA amplification was successfully obtained from non-invasive samples like feathers and environmental dust. These sampling protocols, being very convenient, deserve to be further investigated in terms of sensitivity for CIAV detection.

INTRODUZIONE

Chicken Infectious Anaemia Virus (CIAV), agente eziologico dell'anemia infettiva del pollo, è un virus a DNA di piccole dimensioni, 2298 nucleotidi (nt), appartenente alla famiglia *Anelloviridae*, genere *Gyrovirus* (Rosario *et al.*, 2017). Il genoma è costituito da tre *Open Reading Frame* che codificano per tre proteine virali denominate: VP1, VP2 e VP3.

VP1 è la proteina del capsido (Renshaw *et al.*, 1996), con funzioni nella infezione e replicazione virale. Presenta una regione genomica ipervariabile costituita da 13 amminoacidi (aa) situata in posizione 139-151 (Noteborn *et al.*, 1991); importante per la caratterizzazione molecolare dei ceppi (Schat, 2003). Le proteine virali VP2 e VP3 sono non strutturali (Noteborn *et al.*, 1994).

L'infezione da CIAV provoca forma clinica quando avviene, sia per via verticale sia per via orizzontale, nelle prime settimane di vita. Il virus determina anemia aplastica e gli animali colpiti presentano depressione, atrofia del timo, del midollo osseo ed emorragie diffuse. Quando l'infezione avviene dopo le 3 settimane di età la malattia si manifesta prevalentemente in forma subclinica, causando una significativa immunosoppressione. Le cellule target del virus sono gli emocitoblasti nel midollo osseo e i precursori dei linfociti T nel timo (Balamurugan and Kataria, 2006). Ad oggi è conosciuto un unico sierotipo (Yuasa and Imai, 1986), tuttavia, sulla base della sequenza aa della VP1, è possibile distinguere all'analisi filogenetica 3 genotipi di

CIAV, denominati I, II e III (Ducatez *et al.*, 2006).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare dal punto di viste molecolare, ceppi di CIAV circolanti in Italia. Allo scopo è stato messo a punto un protocollo PCR nested per l'amplificazione ed il sequenziamento di una porzione genomica della VP1 e le sequenze ottenute sono state impiegate in analisi di sequenza e filogenetica.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 25 ceppi di CIAV evidenziati negli anni 2018-2019 durante attività diagnostica di routine svolta dal Servizio di Patologia Aviare del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, dell'università di Bologna. I campioni di partenza erano costituiti da polveri ambientali, tessuti, tamponi cloacali e penne da polli di diverse categorie produttive (Tabella 2).

Tabella 2 Campioni positivi a CIAV oggetto di analisi molecolare.

CEPPO CIAV	Matrice	Categoria produttiva	Regione di provenienza
CIAV/IT/CK/855/17	Penne	Polli Rurali	Toscana
CIAV/IT/CK/906-06/18	Borsa di Fabrizio	Broiler	Veneto
CIAV/IT/CK/909-06/18	Penne	Broiler	Veneto
CIAV/IT/CK/1196/19	Tampone cloacale	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/986-1/18	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/986-2/18	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/986-6/18	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1099/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1100/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1101/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1153/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Abruzzo
CIAV/IT/CK/1155/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1157/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1179/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1180/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1185/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1186/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1187/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1188/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1189/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1191/19	Polvere	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/1192/19	Polvere	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/1195/19	Polvere	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/1201/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia

Estrazione del DNA virale

L'estrazione del DNA virale dalle varie matrici in esame è stata eseguita utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL). Quando il campione in esame era costituito da polveri ambientali, prima dell'estrazione del DNA il campione è stato trattato come descritto da Mescolini *et al.*, (2019).

PCR nested per CIAV

L'analisi molecolare per l'identificazione di CIAV è stata eseguita mediante un protocollo di PCR nested (Tabella 1).

Tabella 1 Primer utilizzati nel protocollo di PCR nested per CIAV utilizzato per la caratterizzazione molecolare.

	SEQUENZA (5'-3')	POSIZIONE NEL GENOMA	DIMENSIONE AMPLIFICATO (bp)
CIAV 1 FOR	CAGGGTAAGCGAGCTAAAAG	751-770	1528
CIAV 1 REV	GCTGCGTTTATTGAGTGC	2262-2279	
CIAV 2 FOR	GGTACGTATAGTGTGAGGC	996-1014	790
CIAV 2 REV	GCTGTGAGTGTGCAAAGCT	1767-1786	

Per ogni reazione di PCR dal volume finale di 25 µl, veniva preparata la seguente mix di reazione: 0,5 µl di primer senso, 0,5 µl di primer antisenso, 5 µl 5X PCR GoTaq® *Reaction Buffer* (Promega); 0,125 µl di GoTaq® *DNA Polymerase* (Promega); 0,5 µl di dNTP (Promega); 11,625 µl di acqua per biologia molecolare. A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 5 µl di DNA.

I cicli della PCR1 consistevano in: pre-denaturazione a 94°C per 2 min, 35 cicli di amplificazione caratterizzati da una fase di denaturazione (a 94°C per 1 min), una di appaiamento (a 50°C per 1 min) ed una di estensione 72°C per 1,30 min, seguita da una fase di estensione finale a 72°C per 5 min. I cicli della PCR2 erano uguali a quelli precedentemente descritti eccetto la fase di estensione che consisteva in 72°C per 40 sec.

Analisi di sequenza e filogenetica

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio ExoSAP-IT™ *Express PCR Cleanup* (ThermoFisher Scientific), e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands). 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 costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood del software Mega X (Kumar *et al.*, 2018). I valori di bootstrap, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

RISULTATI

Da tutti i campioni esaminati sono stati ottenuti prodotti di amplificazione delle dimensioni attese. L'analisi delle sequenze amminoacidiche ha evidenziato nella VP1 residui precedentemente descritti come marker di virulenza o evidenziati in ceppi virulenti (Tabella 3) (Islam *et al.*, 2002).

Tabella 3 Analisi della sequenza amminoacidica di ceppi CIAV ottenuti nella presente indagine e di ceppi di presenti sul database Genbank, in paragone con il ceppo vaccinale di riferimento Del-Ros USA(AF313470).

Posizione aa	Amminoacidi codificati										
	22	75	97	125	139	144	149	157	254	287	290
CEPPI CIAV											
Del-Ros USA(AF313470)	H	V	M	I	K	E	C	V	E	S	A
Cux-1-N (M55918)	D	.	.	G	A	.
Cux-1-M (M81223)	D	.	.	.	A	.
Nobilis P4 vaccine VP1 gene (AJ890284)	M	G	T	.
26P4 (D10068)	M	G	T	.
CAV/SLA3/13 VP1, Poland (KM458182)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/OPL3/13 VP1, Poland (KM458178)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
Australia (AF227982)	T	.
BD-3 Bangladesh (AF395114)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/Ibadan.NIE/11.02/100, Nigeria (AJ888519)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CAV/Lanlate.NIE/11.02/71, Nigeria (AJ888528)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
Vaccine strain 3711/ck/Australia (EF683159)
AH6, China (DQ124935)	Q	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV isolate 8, Taiwan (KJ728819)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
G17.33.3, Vietnam (MH536104)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
HLJ15108, China (KY486137)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
SD1511, China (KU641015)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	P
SD1514, China (KU645521)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
SD1518, China (KU645522)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
69 VP1, Slovenia (DQ016140)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
98D02152, Alabama (AF311892)
1106TN05, Taiwan (KY888897)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV-EG-2, Egypt (MH001553)	Q	M

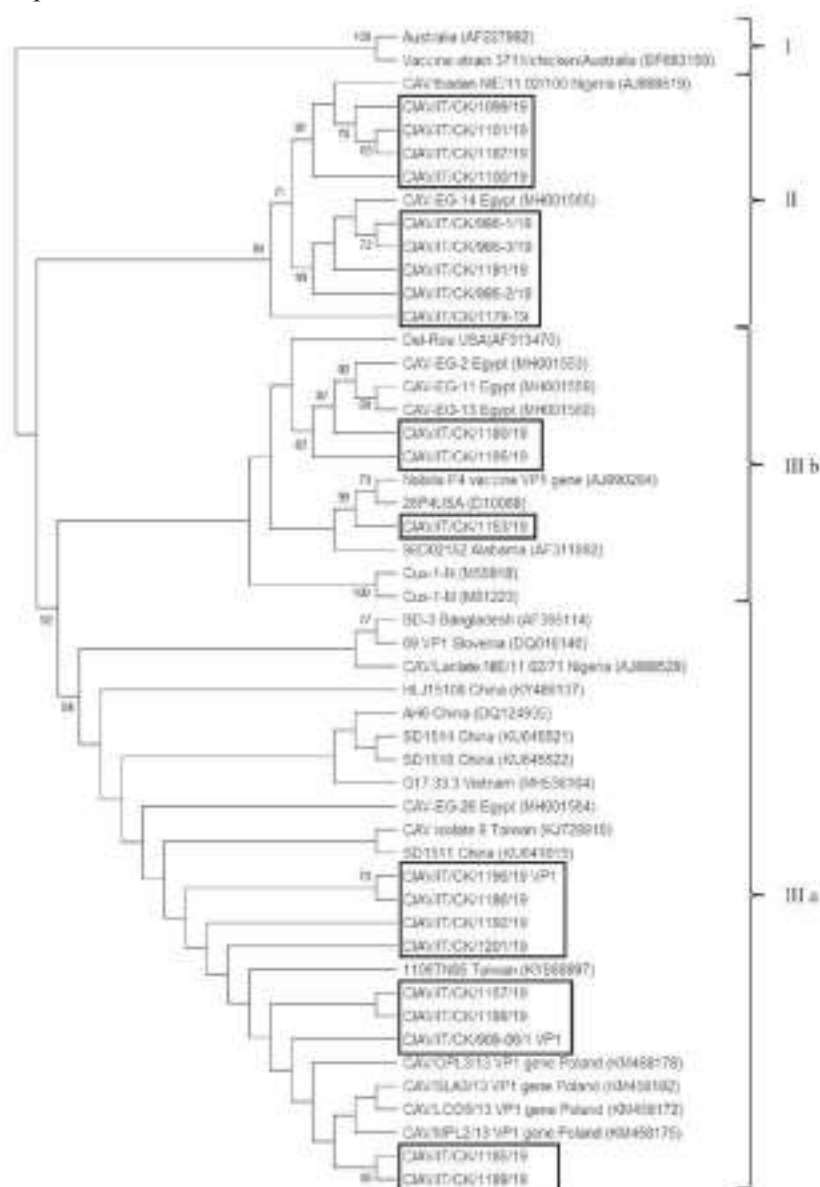
CAV-EG-14, Egypt (MH001565)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	P
CAV-EG-11, Egypt (MH001559)	Q	M
CAV-EG-13, Egypt (MH001560)	Q	M
CAV-EG-26, Egypt (MH001564)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/LOD5/13 Poland (KM458172)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/MPL2/13, Poland (KM458175)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/909-06/1 VP1	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1196/19 VP1	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/986-1/18	-	I	L	L	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/986-2/18	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/986-3/18	-	I	L	L	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/1099/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1100/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1101/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1153/19	-	M	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1157/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1179/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1180/19	-	M
CIAV/IT/CK/1185/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1186/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1187/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1188/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1189/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1191/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/1192/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1195/19	-	.	L	.	Q	Q	M
CIAV/IT/CK/1201/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.

- sequenza non disponibile

. residuo amminoacidico uguale al ceppo di riferimento Del-Ros USA(AF313470).

Il ceppo denominato CIAV/IT/CK/1153/19 ha mostrato un profilo aa con identità aminoacidica del 99,1% con il ceppo vaccinale 26P4. L'analisi filogenetica ha rivelato una certa eterogeneità molecolare dei ceppi analizzati che si raggruppano in cluster distinti sia con ceppi del genotipo II sia del genotipo III (Ducatez *et al.*, 2006) (Figura 1).

Figura 1 Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche dei ceppi CIAV analizzati nel presente studio (evidenziati nei riquadri in grassetto) e di ceppi di riferimento presenti sul database Genbank.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro vengono per la prima volta caratterizzati ceppi CIAV provenienti da diverse aree geografiche Italiane. L'amplificazione del DNA virale è stata ottenuta con successo, oltre che da matrici convenzionali quali organi, anche da penne e, soprattutto da polveri ambientali. Queste ultime modalità di campionamento non sono invasive e risultano essere di facile esecuzione (Davidson, 2019), per cui meritano di essere ulteriormente studiate essendo valide alternative ai campionamenti tradizionali. L'analisi filogenetica, condotta sulla proteina VP1, ha mostrato eterogeneità genetica nei ceppi esaminati che risultano appartenere ai genotipi II, IIIa e IIIb (Ducatez *et al.*, 2006) o anche, in un caso, essere di origine vaccinale. L'analisi di sequenza ha inoltre mostrato la presenza di sostituzioni amminoacidiche già descritte in bibliografia, peculiari dei ceppi virulenti (Islam *et al.*, 2002). Futuri studi tesi ad ottenere la sequenza completa del genoma dei CIAV circolanti in Italia potranno fornire nuovi dati, in grado di confermare quanto evidenziato dalla parziale caratterizzazione della VP1.

BIBLIOGRAFIA

1. Balamurugan, V. and Kataria, J. M., (2006). Economically important noncongenic immunosuppressive viral diseases of chicken—current status. *Veterinary Research Communications*, 30(5), 541–566.
2. Brown H. K., Browning G. F., Scott P. C., Crabb B. S. (2000). Full-length infectious clone of a pathogenic Australian isolate of chicken anaemia virus. *Aust. Vet. J.* 78(9):637-40.
3. Davidson I. (2019). Biotic concerns in generating molecular diagnosis matrixes for 4 avian viruses with emphasis on Marek's disease virus. *J Virol Methods*. [Epub ahead of print].
4. Ducatez M. F., Owoade A. A., Abiola J. O., Muller C. P. (2006). Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch. Virol.* 151:97-111.
5. Islam M.R., Johne R., Raue R., Todd D., Muller H. (2002). Sequence Analysis of the Full Length Cloned DNA of a Chicken Anaemia Virus (CAV) Strain from Bangladesh: Evidence for Genetic Grouping of CAV Strains Based on the Deduced VP1 Amino Acid Sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49:332-337.
6. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). *Molecular Biology and Evolution.* 35:1547-1549.
7. Li Y., Fang L., Cui S., Fu J., Li X., Zhang H., Cui Z., Chang S., Shi W., Zhao P. (2017). Genomic characterization of recent chicken Anemia virus isolates in China. *Front. Microbiol.* 8, 401.
8. Mescolini G., Lupini C., Quaglia G., Berto G., Tovani A., Ceroni S., Muccioli F., Catelli E. (2019). Monitoraggio ambientale della circolazione del virus della Malattia di Marek in allevamenti di broiler e di riproduttori pesanti. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2019. IV Simposio Scientifico, Bologna 22 Novembre 2019.*
9. Noteborn M. H., de Boer G. F., van Roozelaar D. J., Karreman C., Kranenburg O., Vos J. G., van der Eb A. J. (1991) Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology*, 65, 3131-3139.

10. Noteborn M. H., Todd D., Verschueren C.A., de Gauw H.W., Curran W.L., Veldkamp S., Douglas A.J., McNulty M.S., van der Eb A.J., Koch G. (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology*, 68:346-351.
11. Renshaw, R. W., Soiné, C., Weinkle, T., O'Connell, P. H., Ohashi, K., Watson, S., Lucio B., Harrington S., Schat K.A. (1996). A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J. Virol.* 70, 8872–8878.
12. Rosario K., Breitbart M., Harrach B. (2017). Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch. Virol.* 10.1007/s00705-017-3247-y.
13. Schat K.A. (2003). Chicken infectious anemia. In: Saif Y.M., editor. *Diseases of poultry*. Iowa: Iowa State Press; 2003. p. 182–202.
14. Yamaguchi S., Imada T., Kaji N., Mase M., Tsukamoto K., Tanimura N., Yuasa N. (2001). Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J. Gen. Virol.* 82:1233-1238.
15. Yuasa N., Imai K. (1986). Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* 15:639-645.

VARIAZIONE DEI PARAMETRI IMMUNOLOGICI IN BROILER SPF A SEGUITO DELL'APPLICAZIONE DI DUE DIVERSI PROGRAMMI VACCINALI PER MALATTIA DI GUMBORO

Russo E.¹, Quaglia G.², Mescolini G.², Salaroli R.², Catelli E.², Boldini S.¹, Forni M.², Lupini C.²

¹ MSD Animal Health, Segrate (MI)

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

Summary

Between immunosuppressive chicken viral diseases, Infectious bursal disease (IBD) is one of the most widespread. This disease is primarily controlled through vaccination, as many other diseases like Infectious Bronchitis (IB). In this study the immunological response to IB vaccination was evaluated in groups with different vaccination protocols against IBDV: rHVT-ND-IBD vaccine (group A), immune complex IBD vaccine (group B) and unvaccinated (group C).

In trail n.1, sixty chickens were divided in groups A (n.24), B (n.24) and C (N.12), and day-old vaccinated for IBDV. At 14, 18 and 35 days birds were sacrificed for bursa evaluation. Group B showed a severe bursal atrophy at all sampling points, and a significantly lower bursa-body weight ratio ($p<0.05$).

In trial n.2, forty chickens (n. 17 in group A, n.17 in B, n.6 in C) were housed in isolators, day old vaccinated for IBDV and, at 14 days vaccinated against IB. At the day of vaccination and at 7, 14, 21 and 28 days post IB vaccination, blood samples for ELISA IB antibody evaluation were collected. The antibody titers against IB were significantly lower in group B than in group A. At 42 days of age (28 days post IB vaccination) birds were all euthanized, and post-mortem evaluation was performed. Harderian gland, spleen and trachea were collected for citofluorimetric evaluation. The groups showed similar relative numbers of CD45+, Bu-1a+ and CD4+ cells, CD8+ cells were more abundant in group B ($p<0,05$). Similar alterations were already reported for virulent IBDV infected and immunosuppressed birds.

The group vaccinated with the immunocomplex vaccine induced bursal atrophy and immunosuppression highlighted by serology against IB and confirmed by cytofluorimetric alterations.

INTRODUZIONE

Il virus della Bursite infettiva (IBDV), agente causale della bursite infettiva aviaria (IBD) o malattia di Gumboro, appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. Gli IBDV si suddividono in due sierotipi: al sierotipo 1 appartengono tutti i ceppi patogeni, a loro volta classificati in base a patogenicità e virulenza; al sierotipo 2 appartengono ceppi apatogeni (1).

Tutti i ceppi del sierotipo 1, indipendentemente dalla loro patogenicità, causano dei danni alla Borsa di Fabrizio, e immunosoppressione di grado variabile in funzione del ceppo, della presenza d'immunità materna e dell'età del soggetto infettato; le prime 3 settimane di vita rappresentano il periodo più critico.

L'unico modo di prevenire i danni da IBD è la vaccinazione. I vaccini attualmente

disponibili sul mercato sono di 3 tipi: vivi attenuati, ad immunocomplessi (vaccino vivo attenuato legato a anticorpi specifici per IBDV), vettori virali (Herpes virus del tacchino - HVT) ingegnerizzati in modo tale da esprimere la proteina di superficie VP2 di IBDV (2).

Alcuni vaccini vivi attenuati possono causare lesioni alla Borsa di Fabrizio simili a quelle indotte dal virus di campo (3), con possibili conseguenze negative sull'immunocompetenza degli animali.

La Bronchite Infettiva (IB) è una patologia respiratoria virale altamente contagiosa diffusa a livello mondiale. IB viene controllata principalmente tramite vaccinazione con vaccini vivi attenuati, ma la risposta a questi vaccini può essere compromessa da stati di immunodeficienza dovuti a patologie virali come IBD (4).

Lo scopo di questo lavoro è confrontare la risposta immunitaria a vaccinazione per IB di animali vaccinati per IBD con un vaccino vettorizzato che esprime proteine di superficie di IBDV e del virus della malattia di Newcastle (rHVT-ND-IBD), o con vaccino ad immunocomplessi (Winterfield 2512 IBDv + anti-IBD-antibody).

MATERIALI E METODI

Trial 1

Sessanta pulcini SPF broiler maschi di un giorno sono stati suddivisi in 3 gruppi e vaccinati come segue: A1 (24 animali, vaccinati per IBD con rHVT-ND-IBD), B1 (24 animali, vaccinati per IBD con vaccino ad immunocomplessi) e C1 (12 animali, gruppo di controllo non vaccinato). Gli animali sono stati accasati, alimentati con mangime *ad libitum* e sacrificati, quindi sottoposti ad esame *post mortem* a 14 giorni (14 animali gruppi A1 e B1, 4 animali gruppo C1), 28 giorni (5 animali gruppi A1 e B1, 4 animali gruppo C1) e 35 giorni (5 animali gruppi A1 e B1, 4 animali gruppo C1). Le borse di Fabrizio sono state valutate macroscopicamente, pesate, e, per ogni animale è stato determinato il rapporto peso della Borsa / peso vivo ($B:BW = [\text{peso della Borsa di Fabrizio (g)}/\text{peso vivo dell'animale (g)}] \times 1000$). Le medie sono state confrontate usando il test di Kruskal-Wallis, e la differenza è stata considerata statisticamente significativa per $p < 0,05$.

Trial 2

Quaranta pulcini SPF broiler femmine di un giorno sono stati suddivisi in 3 gruppi e vaccinati come segue: A2 (17 animali, vaccinati per IBD con rHVT-ND-IBD), B2 (17 animali, vaccinati per IBD con vaccino ad immunocomplessi) e C2 (6 animali, gruppo di controllo non vaccinato). Gli animali sono stati accasati in 7 isolatori, alimentati con mangime *ad libitum* e, al giorno 14 sono stati vaccinati per IB con vaccini vivi attenuati mediante goccia nell'occhio.

Gli animali sono stati sottoposti a prelievi di sangue il giorno della vaccinazione e a 7, 14, 21 e 28 giorni post vaccinazione. I sieri sono stati analizzati per la ricerca di anticorpi nei confronti di IB con kit ELISA commerciale (IDEXX IBV Ab Test-IDEXX, USA). Le medie geometriche dei titoli anticorpali sono state confrontate usando un t-test di Student, e la differenza è stata considerata statisticamente significativa per $p < 0,05$.

A 28 giorni gli animali sono stati sacrificati, e sono state campionate la ghiandola di Harder, la milza e la trachea per sottoporle ad esame citofluorimetrico.

L'esame citofluorimetrico è stato impiegato per determinare la quantità di cellule leucocitarie (positive per il marker CD45), e la quantità relativa di cellule che esprimono i marker CD8, CD4 e Bu1a. I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard, e per evidenziare eventuali differenze tra i gruppi sono stati impiegati i test statistici One-way ANOVA e Tukey post hoc, le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p < 0,05$.

Dichiarazione etica

Le due prove sperimentali sono state effettuate in accordo con quanto previsto dalla normativa nazionale sulla sperimentazione animale e sul benessere animale e dopo l'approvazione del piano sperimentale da parte del Ministero della Salute (numero di permesso 478/2016-PR).

RISULTATI

Durante l'esame *post mortem* degli animali appartenenti al trial 1 si è potuta rilevare un'atrofia della Borsa di Fabrizio nel gruppo B1 in tutti i punti di prelievo. Le medie dei rapporti B:BW, per giorno di campionamento sono graficamente riportate nella figura 1. In tutti i punti di prelievo il rapporto B:BW è risultato significativamente più basso ($p < 0,05$) nel gruppo B1 rispetto agli altri gruppi.

I risultati della sierologia del trial 2 sono illustrati in figura 2. Il gruppo A2 ha mostrato titoli anticorpari nettamente più alti di quelli del gruppo B2 ($p < 0,05$) a 14, 21 e 28 giorni post vaccinazione.

L'analisi citofluorimetrica della ghiandola di Harder, della milza e della trachea campionate a 28 giorni post vaccinazione per IB non ha evidenziato nessuna differenza significativa nella quantità di cellule CD45+, Bu1a+ e CD4+ nei tre gruppi, mentre per quanto riguarda le cellule CD8+, il gruppo B presentava valori significativamente più alti degli altri due gruppi ($p < 0,05$) in tutti i tessuti esaminati.

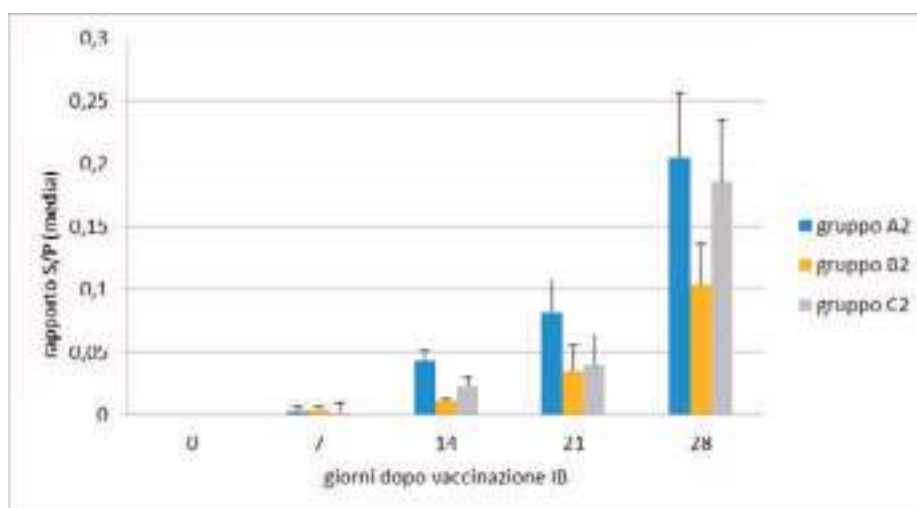


Figura 1. Trial 1. Medie dei rapporti B:BW {[peso della Borsa di Fabrizio (g)/peso vivo (g)] \times 1000} a 14, 28 e 35 giorni di vita.

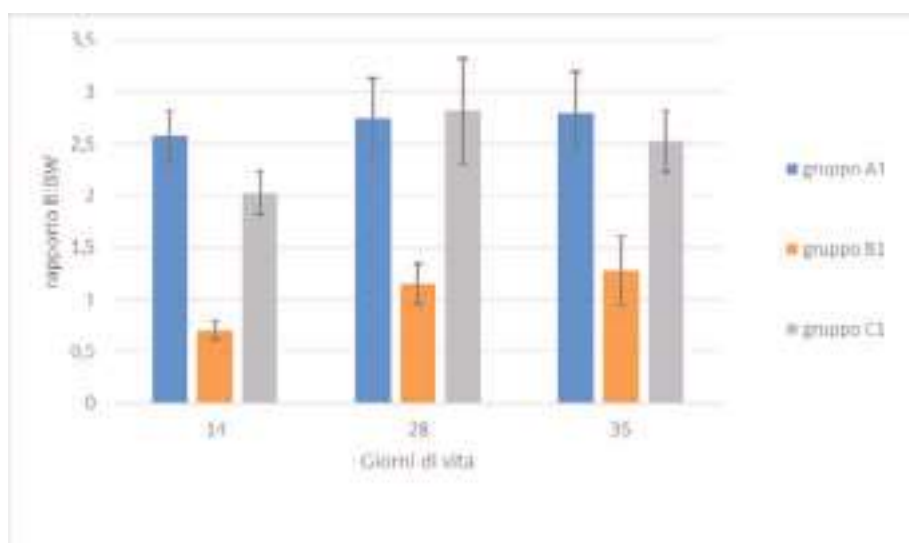


Figura 2. Risultati degli esami sierologici per IB a 0, 7, 14, 21 e 28 giorni post vaccinazione (ELISA IBV Ab kit, IDEXX).

DISCUSSIONE

Il gruppo vaccinato con il vaccino ad immunocomplessi ha presentato una atrofia della Borsa di Fabrizio a 14, 18 e 35 giorni ed una percentuale più alta di cellule CD8+ a 42 giorni di età. Le medesime alterazioni sono già state riportate in animali immunosoppressi a causa di infezioni di campo con ceppi di IBDV virulenti (5, 6). I polli che s'infettano con IBDV precocemente presentano inizialmente un'atrofia della borsa, che poi si ripopola di linfociti B ma ipofunzionali, il risultato è che la percentuale di linfociti B risulta nella norma, ma la capacità di produrre anticorpi è ridotta (7). Durante il presente studio si è riscontrato un risultato analogo nel gruppo vaccinato col vaccino ad immunocomplessi: gli animali così vaccinati hanno infatti mostrato una quantità di cellule Bu1a+ (corrispondenti ai linfociti B) simile agli altri gruppi a 42 giorni di età, ma anticorpi anti IB nettamente inferiori.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio hanno evidenziato come il vaccino ad immunocomplessi determina una atrofia della Borsa di Fabrizio che causa una ridotta risposta immunitaria alla vaccinazione con vaccino vivo attenuato per IBV, mentre il vaccino rHVT-ND-IBD non causa atrofia della borsa di Fabrizio e non interferisce con l'immunità conferita da vaccino vivo IBV.

BIBLIOGRAFIA

1. Rosenberger JK and Cloud SS. (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *Abstracts of the 123rd meeting of the American Veterinary Medical Association* (p. 357). July 20–24, 1986, Atlanta, Georgia, USA.

2. Jackwood DJ. (2017). Advances in vaccine research against economically important viral diseases of food animals: Infectious bursal disease virus. *Veterinary Microbiology*. 206:121–125.
3. Killian MP, Boviez JD, Gambarotta M and Lombardo DM. (2017). Induction of apoptosis in the bursa of Fabricius by vaccination against Gumboro disease. *Avian Pathology*. 46(5): 526-534.
4. Toro H, van Santen VL, Li L, Lockaby SB, van Santen E and Hoerr FJ. (2006). Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis, *Avian Pathology*. 35:6, 455-464
5. Kim IJ, Gagic M and Sharma JM. (1999). Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*; 43(3):401-13.
6. Kim IJ, You SK, Kim H, Yeh HY and Sharma JM. (2000). Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*. 74(19): 8884-92.
7. Withers DR, Young JR and Davison TF. (2005). Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression in the chick is associated with the presence of undifferentiated follicles in the recovering bursa. *Viral Immunology*. 18(1): 127-37.



AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* E *DERMANYSSUS GALLINAE*. UNA RELAZIONE ANCORA DA SCOPRIRE

Schiavone A.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Sangiorgi A.², Magrini M.², Camarda A.¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sezione di Patologia Aviaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

² MSD Animal Health

Summary

Colibacillosis is an infection caused by Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), associated with a wide variety of clinical forms, which has a strong impact on industrial poultry system. The pathogen is persistent in flocks, probably due to its relationship with potential vectors or reservoirs, most of them still unknown. Among those, an important role might be played by *Dermanyssus gallinae*, whose prevalence can even reach 90% of the intensive laying hen farms.

In this work, the association between *D. gallinae* and pathogenic *E. coli* serogroups O2 and O78 has been verified by analyzing mites from 18 Italian laying hen farms, some of them with ongoing colibacillosis outbreaks.

Specifically, 24 populations of *D. gallinae*, from as many flocks of laying hens, were included in the study. Furthermore, 25 mite aliquots were prepared from mites collected in a farm selected for experiencing colibacillosis. Twelve out of those 25 aliquots were washed by 4% formalin.

The detection of *E. coli* was performed by using bacteriological procedures and PCR, while qPCR was used instead of PCR for the detection and quantification of *E. coli* O2 from the 25 aliquots deriving from the colibacillosis focus.

Escherichia coli was detected in 61% of the 18 tested farms. The molecular characterization of the isolates revealed the presence of the serogroups O2 and O78 in the 16% and 5% of the monitored farms, respectively.

In the colibacillosis focus, *E. coli* O2 was detected and isolated from both dead animals and mites. Moreover, *E. coli* was retrieved from both formalin-washed and unwashed aliquots, letting suppose that the pathogen might contaminate the inner parts of mites.

The estimated values of the *E. coli* O2 load per mite and the infection rate (IR) both returned an apparently low mean value, which needs to be weighed against the infestation level inside the flock.

In conclusion, the present study allowed to establish a direct relationship between *D. gallinae* and APEC for the first time, paving the way to the hypothesis that this mite could act as an important reservoir and a potential vector for the disease.

INTRODUZIONE

Le colibacillosi hanno un notevole impatto sull'allevamento avicolo intensivo in tutto il mondo e sono responsabili di perdite economiche rilevanti in tutta la filiera avicola. Esse sono generalmente causate dai cosiddetti Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) [1]. Tra questi, i sierogruppi più frequentemente associati a malattia sono O1, O2, O8, O18, O35, O78, O109 e O115, con gli O1, O2

e O78 che rappresentano l'80% dei casi [2].

Uno degli aspetti più critici delle colibacillosi aviarie è rappresentato dall'elevata persistenza degli APEC, che possono permanere in allevamento per lunghi periodi, e riemergere anche durante cicli successivi [1]. Le ragioni di tale resistenza non sono ancora del tutto note. Se da una parte sicuramente pesano le caratteristiche intrinseche del batterio, per esempio la capacità di formare biofilm, dall'altra la dispersione orizzontale del germe all'interno del capannone può essere favorita dalla presenza di vettori passivi quali *Alphitobius diaperinus* e *Musca domestica* [3, 4, 5].

Non si può escludere però che altri fattori possono intervenire, favorendo la sopravvivenza del germe tra un ciclo e l'altro. Uno di questi potrebbe essere *Dermanyssus gallinae*. Questo acaro ematofago è diffuso in oltre il 90% degli allevamenti avicoli intensivi [6], esercita un'azione depauperante e stressante sugli animali [7], e può fungere da serbatoio e vettore di diversi patogeni del pollame [8].

Ad oggi le informazioni sulla possibile associazione tra *E. coli* e *D. gallinae* sono pressoché assenti, pertanto questo studio si propone di valutare una potenziale relazione tra essi, con particolare attenzione al rapporto che si può instaurare con i sierogruppi patogeni O2 e O78.

MATERIALI E METODI

Indagine a campione

Lo studio è stato condotto su campioni di *D. gallinae* prelevati da 24 gruppi di galline ovaiole facenti parte di 18 allevamenti in tutta Italia, raccolti fra dicembre 2018 e aprile 2019 mediante trappole AVIVET [9] ed inviati in cieco presso la Sezione di Patologia Aviare dell'Università degli Studi di Bari. Qui sono stati sottoposti ad esame batteriologico colturale ed identificazione biochimica mediante sistema MicroBact (Thermo Scientific, Milano, Italia). Gli isolati di *E. coli* sono stati successivamente tipizzati mediante PCR per definirne l'appartenenza ai sierogruppi O2 e O78 [10, 11].

Indagini in campo

Indagini più approfondite sono state effettuate a partire da un allevamento di 22.000 galline ovaiole della provincia di Lecce.

Nell'azienda erano contestualmente presenti un'infestazione da *D. gallinae* di livello IV della scala di Cox [12] ed un focolaio di colibacillosi in atto che faceva registrare una mortalità giornaliera di 4-12 soggetti, associata ad un calo della deposizione stimato del 5% e ad alterazioni qualitative delle uova.

Dieci galline spontaneamente decedute sono state prelevate dall'allevamento e sottoposte ad esame necroscopico, durante il quale sono stati prelevati fegato, milza e sangue del cuore, da cui è stata effettuata la ricerca di *E. coli* mediante la procedura colturale. Anche in questo caso il sierogruppo degli isolati è stato individuato mediante PCR [10, 11].

Gli acari raccolti dallo stesso allevamento sono stati quindi suddivisi in 25 aliquote da 50 o da 100 acari. Dodici di queste sono state sottoposte a lavaggi con formalina al 4%, al fine di valutare se *E. coli* si localizzasse solo all'esterno o anche all'interno di *D. gallinae*. Tutte le aliquote sono state analizzate mediante real-time PCR per l'identificazione e la quantificazione di *E. coli* O2 negli acari. In seguito, sono

stati calcolati la stima di massima verosimiglianza (MLE) del tasso di infezione (IR) degli acari mediante software l'add-in di Microsoft Excel® PooledInfRate [12], e la carica media di *E. coli* O2 per acaro.

RISULTATI

Monitoraggio in cieco

La ricerca di *E. coli* a partire dalle aliquote di acari raccolte dai 18 allevamenti sottoposti a monitoraggio ha evidenziato la presenza di tale specie batterica nel 61% delle aziende testate (11/18). Inoltre, i sierogruppi O2 e O78 sono stati individuati negli acari prelevati dal 22% degli allevamenti; nello specifico, 3 gruppi di acari erano positivi a O2 e 1 a O78.

Studio del caso

L'esame necroscopico eseguito sugli animali prelevati dall'allevamento oggetto di approfondimento ha evidenziato lesioni compatibili con la colibacillosi, in particolare nel quadro della polisierosite. Nello specifico, è stato osservato inspessimento del peritoneo, ovarite con presenza di follicoli ovarici nella cavità addominale, presenza di essudato fibrinoso su pericardio, capsula glissoniana e sacchi aerei. Inoltre, a causa della massiva infestazione da *D. gallinae*, era possibile osservare una grave anemia che si manifestava con decolorazione della cresta e delle mucose, accompagnata dal riscontro di numerosi acari sulle carcasse. *Escherichia coli* O2 è stato isolato dalla maggior parte degli organi prelevati.

E. coli O2 è stato identificato inoltre da 19 delle 25 aliquote di acari, precisamente da 12 su 13 non lavate, e da 7 su dodici lavate con formalina.

Alla luce di questi risultati la stima della IR è stata pari a 24,39 acari infetti su 1.000, con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 13,71 e 56,88%.

Invece, la carica di *E. coli* O2 per acaro era molto variabile. Negli acari non lavati è stata calcolata una media pari a 516,59 cellule per acaro, e a 315,00 cellule per acaro nelle aliquote lavate. Tale differenza è risultata essere non significativa ($P=0,650$).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio supportano fortemente la tesi di un'associazione fra *D. gallinae* ed *E. coli*. L'indagine condotta sulle popolazioni di acari, infatti, ha consentito di isolare il batterio in più della metà degli allevamenti testati, anche con il riscontro di sierogruppi potenzialmente patogeni quali O2 e O78.

Inoltre, l'analisi del focolaio di colibacillosi ha messo in evidenza che *D. gallinae* ospitava lo stesso sierogruppo di *E. coli* che stava causando la malattia nelle galline ovaiole. Tale associazione sembra particolarmente interessante, visto che il patogeno non è soltanto un mero contaminante superficiale dell'acaro, ma che esso è in grado di penetrare, attraverso la cuticola o direttamente attraverso il pasto di sangue, nei distretti interni dell'artropode.

Anche il tasso d'infezione è piuttosto significativo, in quanto è dello stesso ordine di grandezza di quello riscontrato per *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Gallinarum* [14]. Nonostante esso sia apparentemente basso (circa 24 acari infetti ogni mille) si deve tener conto dei livelli di infestazione osservabili in campo. È noto, infatti, che in caso di infestazioni massive ogni notte almeno 50.000 acari possono

nutrirsi su una singola gallina [15]. Questo implica che ogni gallina potrebbe venire a contatto, ogni notte, con centinaia di acari infetti. Ovviamente, sarà necessario disegnare studi appropriati per avere il necessario riscontro della trasmissione dall'acaro all'ospite per poter definire *D. gallinae* come vettore.

CONCLUSIONI

Questo è, per quanto di nostra conoscenza, il primo lavoro che ha dimostrato l'associazione esistente fra *D. gallinae* ed *E. coli*, in particolare nei confronti dei sierogruppi patogeni O2 e O78. Si tratta di uno studio preliminare, i cui dati potrebbero però aprire all'ipotesi che *D. gallinae* possa avere un ruolo determinante nella circolazione e nella persistenza di ceppi APEC.

BIBLIOGRAFIA

1. Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt J, Abdul-Aziz T and Logue CM (2013). Colibacillosis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL and Nair V (Eds.), *Diseases of Poultry 13th Edition*, John Wiley & Sons, Hoboken, US. pp. 751-805.
2. KATHAYAT D, HELMY YA, DEBLAIS L, RAJASHEKARA G. (2018) NOVEL SMALL MOLECULES AFFECTING CELL MEMBRANE AS POTENTIAL THERAPEUTICS FOR AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *SCI. REP.* 8: 15329.
3. Goodwin MA and Waltman WD (1996). Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. *J. Appl. Poult. Res.* 5: 51-55.
4. McAllister JC, Steelman CD, Skeeles JK, Newberry LA and Gbur EE (1996). Reservoir competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales:Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.* 33: 983-987.
5. Rochon K, Lysyk TJ and Selinger LB. (2005). Retention of *Escherichia coli* by house fly and stable fly (Diptera:Muscidae) during pupal metamorphosis and eclosion. *J. Med. Entomol.* 42: 397-403.
6. Sparagano OAE, Pavličević A, Murano T, Camarda A, Sahibi H, Kilpinen O, Mul-M, van Emous R, le Bouquin S, Hoel K and Cafiero MA. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Exp. Appl. Acarol.* 48: 3-10.
7. Sigognault Flochlay A, Thomas E and Sparagano O. (2017). Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasit. Vectors* 10: 357.
8. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OAE and Zenner L. (2009). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp. Appl. Acarol.* 48: 93-104.
9. Lammers GA, Bronneberg RGG, Vernooij JCM and Stegeman JA. (2017). Experimental validation of the AVIVET trap, a tool to quantitatively monitoring the dynamics of *Dermanyssus gallinae* population in laying hens. *Poult. Sci.* 96: 1563-1572.
10. Liu B, Wu F, Li D, Beutin L, Chen M, Cao B and Wang L. (2009). Development of a serogroup-specific DNA microarray for identification of *Escherichia*

- coli* strains associated with bovine septicemia and diarrhea. *Vet. Microbiol.* 142: 373-378.
11. Fratamico PM, Yan X, Liu Y, DebRoy C, Byrne B, Monaghan A, Fanning S and Bolton D. (2010). *Escherichia coli* serogroup O2 and O28ac O-antigen gene cluster sequences and detection of pathogenic *E. coli* O2 and O28ac by PCR. *Can. J. Microbiol.* 56: 308-316.
 12. Mul MF, van Riel JW, Meerburg BG, Dicke M, George DR and Groot Koerkamp PWG. (2015). Validation of an automated mite counter for *Dermanyssus gallinae* in experimental laying hen cages. *Exp. Appl. Acarol.* 66: 589-603.
 13. Biggerstaff BJ. (2009). *PooledInfRate, Version 4.0: a Microsoft Office Excel add-in to compute prevalence estimates from pooled samples*. Center for Disease Control and Prevention, Fort Collins, CO, U.S.A.
 14. Pugliese N, Circella E, Marino M, De Virgilio C, Cocciolo G, Lozito P, Cafiero MA and Camarda A. (2019) Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Gallinarum* biovar *Gallinarum* in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*. *Med. Vet. Entomol.* 33: 162-170.
 15. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ and Giangaspero A. (2014) Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annu. Rev. Entomol.* 59: 447-466.



DIFFUSIONE DEI GENI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA (ARGS) IN ALLEVAMENTI AVICOLI DEL CENTRO ITALIA

Smoglica C.¹, Di Francesco C.E.¹, Profeta F.², Muhammad F.¹, Di Giannatale E.², Toscani T.³, Marsilio F.¹

¹ *Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Loc. Piano D'Accio, 64100 Teramo*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Via Campo Boario, 64100 Teramo;*

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

Summary

In this study a biomolecular investigation for antimicrobial resistances genes (ARGs) was carried out starting from n. 38 litter samples collected from n. 6 poultry and n. 2 turkey flocks. Multiplex PCR for amplification of ARGs against tetracycline, lincomycin, chloramphenicol, aminoglycosides and colistin allowed to detect all genes under study except for *tet(C)* e *tetB(P)* (tetracycline), *aadB* e *aac(3) IV* (aminoglycosides), *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* (colistin). The prevalent genes belong to tetracycline, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(M)* e *tet(K)*, and streptomycin, *aadA2*, in agreement with the data regarding the use of antibiotics in veterinary medicine. A non-invasive sampling method, along with a rapid detection of antimicrobial resistance, could allow to get information regarding the trends on ARGs in farms, the spillover of specific ARGs into the environment and the possibility emergence of ARB in the digestive tract of animals.

INTRODUZIONE

L'uso eccessivo di molecole antimicrobiche rappresenta ancora una delle principali cause dell'instaurarsi dell'antimicrobico resistenza (AMR), responsabile ogni anno di circa 25.000 decessi solo in Europa (Marston *et al.*, 2016).

In base ai dati più recenti, il consumo di antibiotici nel mondo è aumentato del 65% negli anni compresi tra il 2000 e il 2015, raggiungendo i 42 bilioni di dosi definite giornaliere (*defined daily doses* o DDDs) (Cycoń *et al.*, 2019). In Europa, i principali Paesi consumatori di antibiotici nel 2017 sono stati Spagna, Francia e Cipro, al contrario Italia, Finlandia, Germania, Lussemburgo, Norvegia, Svezia e Regno Unito registrano una riduzione significativa del loro utilizzo (ECDC, 2018).

Il trasferimento orizzontale di geni di resistenza (*Antibiotic Resistance Genes* o ARGs) è un importante fattore di disseminazione dell'AMR nell'ambiente, in grado di portare alla selezione e al mantenimento di batteri multi-resistenti. A questo meccanismo si associa la pressione selettiva esercitata dai residui degli antibiotici che vengono eliminati nelle acque e nel terreno attraverso i reflui fognari e le deiezioni animali, spesso utilizzate come fertilizzanti in agricoltura (Bouki *et al.*, 2013; Daghrrir and Drogui, 2013; Wu *et al.*, 2014).

I sistemi di monitoraggio più comuni per valutare la diffusione di batteri multi-resistenti e dei relativi geni di AMR sono basati sull'isolamento di singole specie batteriche a partire da campioni biologici e ambientali e sulle relative prove di antibiogramma. Tale approccio, oltre a richiedere tempi di esecuzione relativamente lunghi, permette

di evidenziare un limitato numero di batteri resistenti, che rappresentano solo una parte del microbiota intestinale e quindi del resistoma, inteso come il complesso degli ARGs che conferiscono AMR ai batteri stessi (Munk *et al.*, 2018).

Al contrario, la ricerca diretta di sequenze specifiche per ARGs mediante prove biomolecolari potrebbe rappresentare uno strumento alternativo di monitoraggio e verifica della presenza di AMR in ambienti ad alta densità microbica come gli allevamenti intensivi. Tale approccio potrebbe aiutare anche ad evidenziare i cambiamenti che possono verificarsi nella composizione del resistoma del tratto intestinale degli animali, in seguito all'applicazione di diverse misure di controllo e profilassi delle infezioni.

Scopo di questo lavoro pertanto è stato di valutare in allevamenti tradizionali di broiler e tacchini del Centro Italia la distribuzione degli ARGs associati alla resistenza nei confronti delle più comuni classi di antibiotici utilizzate nella terapia delle infezioni batteriche.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel periodo compreso tra Novembre 2015 e Dicembre 2016 sono stati campionati n. 6 allevamenti di broiler (Allevamenti B1-B6) e n. 2 di tacchini (Allevamenti T1 e T2) per un totale di n. 8 aziende localizzate in provincia di Teramo.

Per ogni allevamento sono stati prelevati campioni di lettiera mediante sovrascarpe (Agritamp plus02; Biogenetics, Padova, Italia) conformemente a quanto previsto dal Piano nazionale di controllo delle Salmonellosi negli avicoli 2016/2018 (http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2453_allegato.pdf), a inizio ciclo di produzione (indicativamente a partire dai 10 giorni di età degli animali), a metà ciclo, e in prossimità della macellazione, per un totale di n. 38 campioni.

Prove biomolecolari

Ciascun campione è stato diluito al 10% p/v in soluzione fisiologica sterile, quindi miscelato mediante Stomacher (VWR International pbi, Milano, Italia) e sottoposto a trattamento termico a 75° C per 20 minuti. Successivamente 300 µl di ciascuna soluzione sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA mediante Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit, secondo le istruzioni della ditta produttrice (Promega, Italia).

Per lo *screening* biomolecolare sono stati allestiti protocolli di multiplex PCR per la ricerca degli ARGs specifici per tetracicline [*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tetB(P)*, *tetA(P)*], lincomicina [*lnu(A)*, *lnu(B)*], cloramfenicolo [*CatA1*], aminoglicosidi [*aadA2*, *aadB*, *aac(3)IV*] e colistina [*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*] (Lyras and Rood, 1996; Bozdogan *et al.*, 1999; Lina *et al.*, 1999; Trzcinski *et al.*, 2000; Aminov *et al.*, 2001; Gevers *et al.*, 2003; Kozak *et al.*, 2009; Kikuvu *et al.*, 2010; Prasertsee *et al.*, 2016; Rebelo *et al.*, 2018).

RISULTATI

Tutti gli allevamenti sono risultati positivi a uno o più ARGs, con la più elevata positività multipla (n. 9/19 ARGs) riscontrata nell'allevamento B1 (**Tabella 1**). Negli allevamenti di broiler sono risultati presenti gli ARGs di tutte le classi anticorpali, ad eccezione dei geni per la colistina, mentre nei tacchini non sono risultati evidenziabili

i geni del cloramfenicolo oltre che della colistina.

Più in dettaglio, i geni *tet(A)*, *tet(B)* e *CatA1* sono risultati presenti esclusivamente nei broiler e sempre nella stessa specie il numero di campioni positivi per i geni *tetA(P)*, e *lnu(A)* risulta maggiore rispetto ai tacchini. Per entrambe le specie, infine, non sono stati amplificati i geni *tet(C)* e *tetB(P)*, *aadB* e *aac(3)IV*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*.

Il numero più elevato di campioni positivi (35/38; 92%) è stato ottenuto per il gene *aadA2* coinvolto nella resistenza nei confronti della streptomina (Nhung et al., 2017) e a seguire per gli altri ARGs delle tetracicline, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(M)* e *tet(K)* (Tabella 2).

Tabella 1. Percentuali di positività ottenute nei singoli allevamenti per gli ARGs amplificati mediante multiplex PCR.

Allevamento	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>lnu(B)</i>	<i>CatA1</i>	<i>aadA2</i>
B1	100%	33%	67%	100%	0%	100%	67%	33%	100%	100%
B2	100%	17%	17%	50%	17%	0%	17%	0%	67%	100%
B3	50%	100%	0%	50%	0%	0%	50%	0%	100%	100%
B4	0%	0%	20%	0%	80%	80%	0%	60%	40%	80%
B5	0%	0%	0%	100%	50%	50%	25%	50%	0%	75%
B6	0%	0%	50%	50%	50%	75%	25%	0%	0%	75%
T1	0%	0%	50%	90%	50%	50%	10%	20%	0%	100%
T2	0%	0%	25%	75%	75%	50%	0%	50%	0%	100%

Tabella 2. Numero di campioni risultati positivi alle prove di multiplex PCR negli allevamenti di broiler e tacchini per ogni ARG riscontrato

	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>lnu(A)</i>	<i>lnu(B)</i>	<i>CatA1</i>	<i>aadA2</i>
Allevamenti Broiler	10	4	6	13	9	12	6	6	11	21
Allevamenti Tacchini	0	0	6	12	8	7	1	4	0	14
Totale	10	4	12	25	17	19	7	10	11	35

DISCUSSIONE

L'indagine condotta, seppur preliminare, mostra un'ampia diffusione degli ARGs negli allevamenti campionati, con lievi differenze per la classe di antibiotici investigati e la specie coinvolte.

Gli ARGs risultati più presenti nelle letture sono quelli per gli aminoglicosidi e le tetracicline, in linea con i dati disponibili sui consumi di molecole antimicrobiche, che indicano proprio questi antibiotici tra i più utilizzati in campo veterinario (Munk et al., 2018; van Duijkeren et al., 2019).

È da considerare che la maggior parte degli ARGs indagati sono di origine plasmidica, potenzialmente trasmissibili per via orizzontale, in associazione ad altri geni di resistenza e pertanto trasferibili anche a batteri patogeni per il pollame e per l'uomo (Argudín *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda le specie avicole, studi recenti evidenziano profili di resistenza nei confronti delle tetracicline che coinvolgono l'86% e il 47% dei ceppi di *Salmonella enterica* ed *E. coli*, isolati da carcasse di polli e tacchini (Mehdi *et al.*, 2018; Roth *et al.*, 2019).

Infine, la resistenza nei confronti della colistina, considerata emergente per alcuni Paesi europei tra cui l'Italia, non sembra essere confermata dal presente studio (Munk *et al.*, 2018).

I dati riportati sono stati ottenuti da campioni ambientali prelevati tra il 2015 e il 2016, quindi, potrebbero non rispecchiare la situazione attuale. Pertanto, sarebbe utile ripetere lo *screening* molecolare, coinvolgendo un numero superiore di allevamenti, al fine di evidenziare eventuali cambiamenti nei livelli di contaminazione da ARGs. La loro diffusione, infatti, potrebbe essere correlata a fattori come il consumo di antibiotici, che negli ultimi anni, soprattutto nel settore avicolo, ha mostrato una forte contrazione (Caucci *et al.*, 2019), e a nuove tipologie di allevamento come le linee *antibiotic-free*.

CONCLUSIONI

Lo screening molecolare applicato in questo studio, associato ad un metodo di campionamento rapido e non invasivo, può rappresentare uno strumento aggiuntivo di monitoraggio dell'AMR, in grado di fornire ulteriori informazioni sulla reale distribuzione del fenomeno nelle produzioni avicole.

Studio condotto nell'ambito del Progetto "Demetra" (Dipartimenti di Eccellenza 2018 – 2022, CUP_C46C18000530001), finanziato dal Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca

BIBLIOGRAFIA

1. AAVV. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption. In ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC, 2018.
2. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N and Mackie RI. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:22-32.
3. Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, Nonhoff C and Roisin S. (2017). Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics (Basel)*. 6(2). pii: E12.
4. Bouki C, Venieri D and Diamadopoulos E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91: 1-9.
5. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo M, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ and Leclercq R. (1999). A new resistance gene, *linB*, conferring resistance

- to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 925–929.
6. Caucci C, Di Martino G, Dalla Costa A, Santagiuliana M, Lorenzetto M, Capello K, Mughini-Gras L, Gavazzi L and Bonfanti L. (2019). Trends and correlates of antimicrobial use in broiler and turkey farms: a poultry company registry-based study in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* pii: dkz212.
 7. Cycoń M, Mroziak A and Piotrowska-Seget Z. (2019). Antibiotics in the Soil Environment-Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Front. Microbiol.* 10: 338.
 8. Daghbir R and Drogui P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.* 11: 209-227.
 9. Gevers D, Danielsen M, Huys G and Swings J. (2003). Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1270-1275.
 10. Kikui GM, Ombui JN and Mitema ES. (2010). Serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolates from pigs at slaughter in Kenya. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4(4): 243-8.
 11. Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ and Jardine C. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(3): 559-66.
 12. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F and Etienne J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1062-1066.
 13. Lyras D and Rood JI. (1996). Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(11): 2500-2504.
 14. Marston HD, Dixon DM, Knisely JM, Palmore TN and Fauci AS. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA.* 316(11): 1193-1204.
 15. Mehdi Y, Létourneau-Montminy MP, Gaucher ML, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Brar SK, Côté C, Ramirez AA and Godbout S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim. Nutr.* 4(2): 170-178.
 16. Munk P, Knudsen BE, Lukjancenko O, Duarte ASR, Van Gompel L, Luiken REC., Smit LAM, Schmitt H, Garcia AD, Hansen RB, Petersen TN, Bossers A, Ruppé E; EFFORT Group, Lund O, Hald T, Pamp SJ, Vigre H, Heederik D, Wagenaar JA, Mevius D and Aarestrup FM. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nat. Microbiol.* 3(8): 898-908.
 17. Nhung NT, Chansiripornchai N and Carrique-Mas JJ. (2017). Antimicrobial Resistance in Bacteria Poultry Pathogens: A review. *Front. Vet. Sci.* 4:126.
 18. Prasertsee T, Khantaprab N, Yamsakul P, Santiyanont P, Chokesajjawatee N and Patchnee P. (2016). Repetitive sequence-based PCR fingerprinting and the relationship of antimicrobial-resistance characteristics and corresponding genes among *Salmonella* strains from pigs production. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 6(5): 390-395.

19. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, De Frutos Escobar C, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A and Hendriksen RS. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill.* 23(6).
20. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C and Domig KJ. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult. Sci.* 98(4): 1791-1804.
21. Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W and Dowson CG. (2000). Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 763-770.
22. van Duijkeren E, Schwarz C, Bouchard D, Catry B, Pomba C, Baptiste KE, Moreno MA, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Wester AL, Ignate K, Kunsagi Z and Jukes H. (2019). The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* pii: dkz161.
23. Wu X-L, Xiang L, Yan Q-Y, Jiang Y-N, Li Y-W, Huang X-P, Li H, Cai QY and Mo CH. (2014). Distribution and risk assessment of quinolone antibiotics in the soils from organic vegetable farms of a subtropical city, Southern China. *Sci. Total Environ.* 487: 399-406.

CO-INFEZIONE DI AVIAN ORTHOREOVIRUS E CHICKEN ASTROVIRUS IN BROILER: DIAGNOSI IN REAL-TIME PCR E RILIEVI ISTOLOGICI

Stamilla A.¹, Messina A.³, Sallemi S.³, Lanza M.¹, Puleio R.², Loria G.R.², Cascone G.², Antoci F.²

¹ *Dipartimento Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Di3A), Università di Catania, Italia;*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italia;*

³ *Libero professionista.*

Abstract

The intensive production of chicken meat, commonly called broilers, is spread all over the world and consist of raise animal in sheds on a litter with a controlled climate and with a standard feed. The raising techniques, pushed to the limits to obtain the maximum production of meat, can favor the onset of diseases or in general the loss of income caused by illness. The variety of pathogens for the intensive poultry production chain are well known and generally controlled by modern management techniques. The study investigations, carried out in a poultry farm in eastern Sicily, reports a case of runting stunting syndrome (RSS), within a usual fattening cycle. After a macroscopic analysis some animals appear appears to have delayed development, they had difficulty of ambulation and were exhausted with signs of diarrhea. Once the necropsy was performed, intestinal lesions were detected in three of the five subjects. Then samples were collected for microbiological, parasitic and virologic research, which identified the co-infection with CAstV and ARV by Real-Time PCR, while the histological examination confirmed various degrees of damage to the intestinal mucosa from sub-acute to chronic; there were also lesions affecting the liver and kidneys. The detection of viruses was developed by Real-Time PCR, while the histological analysis was developed by embedding the tissue in paraffin wax, routinely processed stain with hematoxylin and eosin (HE).

RIASSUNTO

La produzione intensiva di carne di pollo (broiler), è diffusa in tutto il mondo e consiste nel far ingrassare l'animale in capannoni al chiuso, su una lettiera, con temperatura e fotoperiodo controllato, utilizzando mangimi standard. Le tecniche di allevamento spinte ad ottenere la massima produzione di carne, possono favorire l'insorgenza di malattie o in generale la perdita di reddito causata dal cattivo stato di salute degli animali. I patogeni a rischio per la filiera produttiva avicola intensiva sono ben noti e generalmente controllati dalle moderne tecniche di management. Lo studio riporta indagini eseguite in una azienda avicola della Sicilia Orientale a seguito del riscontro di mancato accrescimento nei soggetti in produzione. All'interno di un ciclo di ingrasso, sono stati identificati dei soggetti che manifestavano crescita ritardata, taglia e peso al di sotto delle performance di razza, inoltre alcuni presentavano difficoltà a deambulare e segni di diarrea. Effettuata la necropsia, sono state evidenziate lesioni intestinali in tre dei cinque soggetti, quindi sono stati eseguiti campionamenti per ricerca microbiologica, parassitaria, virologica tramite cui è stata identificata la co-infezione da CAstV e ARV mediante Real-Time PCR, mentre l'esame istologico ha confermato a vario grado lesioni alla mucosa intestinale da sub-acuto a cronico; sono presenti anche lesioni a carico del fegato e dei reni.

INTRODUZIONE

Il settore avicolo è il settore zootecnico più sviluppato e in rapida crescita, oltre ad essere il più flessibile tra tutti i tipi di allevamento, spinto da una domanda in costante crescita, si è espanso, consolidato e globalizzato in paesi con i più diversi livelli di reddito e tradizioni religiose. In Italia è realizzato sovente con tecniche di allevamento intensivo di tipo industriale, impiegando ceppi genetici ad elevata velocità di crescita, e regimi alimentari intensivi applicati in condizioni di allevamento strettamente controllato per quanto riguarda i parametri microclimatici (fotoperiodo, umidità, ecc.). In queste condizioni di produzione intensiva, spesso possono verificarsi criticità, quali le condizioni igieniche dei capannoni di ingrasso, indici di stress elevati legati al sovraffollamento, al fotoperiodo o alla temperatura controllata, dando origine a infezioni opportuniste. Le norme sanitarie vigenti mirano al benessere animale e a prevenire qualsiasi maltrattamento degli animali sia durante il ciclo produttivo, trasporto e macellazione. Tuttavia, queste regole non sempre vengono rispettate, spesso per far fronte alla sempre crescente domanda da parte dei consumatori che ha indotto il settore a crescere in modo esponenziale. Tale evidenza non sempre ha visto una contemporanea, adeguata gestione sanitaria degli allevamenti con il presentarsi di forme infettive ben note agli allevatori o ancora da patogeni emergenti, cause frequenti di cali produttivi o peggio, di elevata mortalità che portano a delle grosse perdite economiche. Gli agenti patogeni si diffondono molto facilmente nell'ambiente e può resistere nell'ambiente per molti giorni, anche dopo le operazioni di pulizia e disinfezione. I virus sebbene siano parassiti obbligati delle cellule dell'ospite e teoricamente eliminabili con la gestione sanitaria "tutto pieno, tutto vuoto", in molti casi sopravvivono per giorni anche dopo assenza di animali e disinfezione. Nella nostra indagine descriviamo un focolaio confermato in laboratorio di co-infezione da due virus enterici, spesso ubiquitari, delle specie avicole: l'*Avian Orthoreovirus* (ARV) e il *Chicken Astrovirus* (CAstV).

L'*Avian Orthoreovirus* (ARV) isolato per la prima volta da un pollo selvatico con artrite virale da 1954 (Fahey, 1953), è uno virus aviari più diffusi negli allevamenti avicoli, che causa perdite economiche per la produzione totale (Rosenberger, 1989), appartiene alla famiglia *Reoviridae* e ha il genoma segmentato di dsRNA (D.A. Spandidos, 1976). ARV causa l'artrite e la tenosinovite negli allevamenti di pollame (Heide, 1977), immunodepressione (Savage, 1987), malattie enteriche (Pomeroy, 1967) e sindrome di arresto della crescita (M.A. Goodwin, 1993). Molte specie avicole sono suscettibili, nei broiler causando artrite virale e tenosinovite (H.L. Van der, 1975), questa infezione è in genere caratterizzata da elevata morbilità e mortalità, scarsa conversione alimentare dei mangimi e ritardo della crescita (K.N. Dobson, 1992).

Turkey	TAstV-1 TurkeyAstrovirusType 1
Avastrovirus 1	TAstV-2 TurkeyAstrovirusType 2
Chicken	ANV AvianNephritis
Avastrovirus 2	CAstV Chicken Astrovirus
Duck	DAstV-1 DuckAstrovirusType 1
Avastrovirus 3	DAstV-2 DuckAstrovirusType 2

Tabella 1. Le tre specie di *Astrovirus* in base all'ospite

Il *Chicken Astrovirus* (CAstV) è l'ultimo virus, in ordine di tempo, identificato dalle specie avicole di interesse economico, appartiene alla famiglia *Astroviridae* e ha un genoma ssRNA, non incapsulato (E. Méndez, 2013). Generalmente, gli astrovirus, causano infezioni enteriche e infettano molte specie animali tra cui l'uomo (Smyth, 2017). Secondo il comitato internazionale di tassonomia è possibile distinguere tre specie, vale a dire gli avastrovirus 1, 2 e 3 (Smyth, 2017) (Tab 1), solo due di questi infettano i polli causando problemi di crescita, sviluppo ritardato enterite e lesione renale. *Avian Nephritis* (ANV) è stato isolato per la prima volta nel 1976 da un pulcino di una settimana (Yamaguchi S., 1979), *Chicken Astrovirus* (CAstV) è molto comune nel pollo da carne e ha forti associazioni con malattie di soggetti giovani, infatti, sviluppa una malattia da incubatoio che si verifica prima o durante la schiusa. CAstV è un patogeno enterico trasmesso orizzontalmente per via oro-fecale, o verticalmente da un genitore malato cronico e i pulcini, che al momento della schiusa, spargono un'alta quantità di virus nell'ambiente. CAstV è più resistente alla disinfezione e alla pulizia di altri virus, anche se privo di involucro, può resistere nei capannoni dove viene trasportato da coltteri che possono agire da vettore (Rosenberger J., 2010). La malattia coincide con l'insorgenza di cisti intestinali che riducono l'assorbimento dei nutrienti insieme a una ridotta dimensione dei villi o alla forma alterata degli stessi, altri sintomi comuni includono enterite e diarrea, debolezza delle gambe e piumaggio irregolare (Kouwenhoven B., 1978).



DESCRIZIONE DELL'EPIDEMIA

Durante l'ultimo giorno del un ciclo di ingrasso al fine di valutare il peso raggiunto e le performance di crescita, sono stati selezionati cinque animali, tre di questi presentavano uno sviluppo ritardato come se fossero di età inferiore, i soggetti presentavano inoltre segni clinici come difficoltà motorie, spossatezza, tracce di diarrea nella regione cloacale e gonfiore dei seni infraorbitari. Il peso corporeo di questi tre soggetti era sensibilmente inferiore degli altri due. A seguito della macellazione, sono stati prelevati campioni di organi per l'individuazione di eventuali patogeni intestinali. La razza in allevamento era l'ibrido commerciale Ross 308, soggetti maschi, di 42 giorni di età. L'autopsia ha evidenziato un insufficiente sviluppo della muscolatura del petto, lesioni emorragiche con aree necrotiche al fegato, segni di enterite emorragica in alcuni tratti intestinali.

ANALISI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

I linfonodi cecali dei tre diversi animali sono stati prelevati e sottoposti a screening molecolare per l'individuazione di CAstV e ARV attraverso la Real-Time PCR. Un campione di tampone tracheale è stato utilizzato per il rilevamento di *Avian Metapneumovirus* (aMPV). Per la purificazione è stato utilizzato il protocollo standard del kit commerciale "Kylt® RNA/DNA Purification" mentre per l'amplificazione è stato utilizzato il protocollo commerciale di "Kylt® Chicken Astrovirus", "Kylt® Avian Reovirus" e "Kylt® aMPV A&B"

ESAME ISTOLOGICO

Il fegato, la milza, i reni, gli arti, ed i tratti intestinale del duodeno, del digiuno e dell'ileo sono stati prelevati per lo studio delle lesioni evidenziate in sede autoptica e per indirizzare ulteriori indagini eziologiche. Le parti rappresentative di ciascun campione, sono state fissate in formalina tamponata al 10%, incorporate in paraffina e processate. Sezioni di spessore di 1.25 micron sono state ottenute e colorate con ematossilina ed eosina (EE) per l'esame istologico.

ESAME PARASSITOLOGICO E BATTERIOLOGICO

È stato effettuato un esame parassitologico su feci e contenuto intestinale, per la ricerca di Cestodi, Nematodi o Coccidi. Inoltre, sono state effettuate delle colture su piastra per escludere la possibile presenza di batteri patogeni come *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*.

RISULTATI

Animale	BW (kg)	aMPV	CAstV	ARV
1	3.439	X	X	X
2	1.243	X	V	V
3	1.350	X	V	V
4	1.268	X	V	V
5	3.502	X	X	X

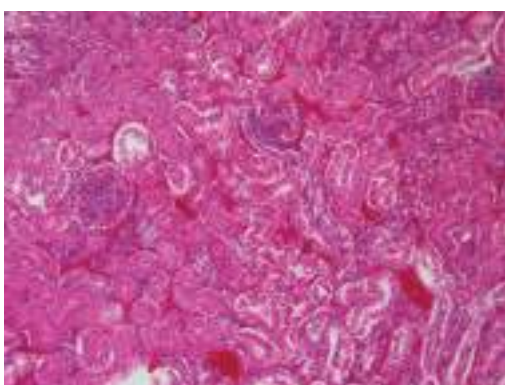
Negli animali numero 2, 3 e 4 sono state osservate enterite emorragica, necrosi epatica e gonfiore dei seni infraorbitari. Durante la necropsia, risultava evidente la dimensione anormale del rene e del fegato dell'animale numero 4, il doppio in dimensione, rispetto agli organi degli altri due animali. Le indagini microbiologiche non hanno evidenziato la presenza di parassiti e/o batteri patogeni. L'analisi molecolare ha confermato il sospetto di una infezione mista di origine virale: i soggetti n. 2, 3 e 4 erano positivi per ARV e CAstV mentre tutti e cinque gli animali sono risultati negativi al aMPV A&B (Tab. 2). Dall'esame istologico è emerso uno stato infiammatorio a carico del fegato con aree focali di infiltrato monocitario e aree di degenerazione; nel rene sono presenti infiltrati multifocali linfo-granulocitari nell'interstizio e necrosi tubulare, mentre nella mucosa intestinale si riscontrano diffusi infiltrati linfocitari con fusione dei villi.

DISCUSSIONE

Lo studio ha evidenziato lo stato di infiammazione a seguito della co-infezione dei virus CAstV e ARV, tutti e due implicati nella sindrome del mancato assorbimento. La presenza di infiltrato sia a livello del fegato che dei reni ha evidenziato che i due virus, a tropismo prevalentemente enterico, possano localizzarsi e creare scompensi anche in altri organi; nel rene determinando una riduzione della funzione filtrante dei glomeruli; nel fegato, causando una degenerazione diffusa nel fegato con un conseguente malfunzionamento dello stesso. Nell'intestino si riscontra il quadro peggiore, dove i villi non posseggono più una struttura organizzata, ma risultano fusi con un diffuso infiltrato linfocitario susseguente all'infezione. Il sospetto iniziale di una infezione virale è stato confermato dall'esame biomolecolare, mentre le analisi batteriologiche e parassitologiche hanno dato esito negativo. L'enterite diffusa riscontrata all'esame anatomico-patologico è stata confermata anche all'esame istologico, con cui sono stati evidenziati anche quadri istolesivi a carico del fegato e del rene. Questo studio preliminare ha offerto molti spunti per analizzare lo stato di infezione negli animali allevati e le possibili fonti di contaminazione e trasmissione dei due virus. Particolare attenzione verrà data al CAstV e ai possibili altri virus che possono essere presenti in co-infezione.



EE 20x, enterite monocitaria



EE 20x, nefrite interstiziale

BIBLIOGRAFIA

1. Bulbule N.R., M. K. (2013). Role of chicken astrovirus as a causative agent of gout in commercial broilers in India. *Avian Pathol.*, 464–473.
2. D.A. Spandidos, a. F. (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.*, 19, 968-976.
3. E. Méndez, A. M. (2013). Replication cycle of astroviruses. *S. Schultz-Cherry (Ed.), Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions, Springer New York, New York*, 19-45.
4. Fahey, J. C. (1953). Studies on chronic respiratory disease Of chickens II. Isolation of A virus.
5. H.L. Van der, M. K. (1975). Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis.*, 19, 683-688.
6. Heide, V. D. (1977). *Viral arthritis/tenosynovitis: a review*. *Avian Pathol.*, 6 (1977), pp. 271-284.

DIFFUSIONE E GENOTIPIZZAZIONE DI *CORONAVIRUS* NEGLI UCCELLI SELVATICI

Trogu T.¹, Canziani S.¹, Parisio G.¹, Lelli D.¹, Sozzi E.¹, Barbieri I.¹, Grilli G.¹, Chiari M.², Lavazza A.¹, Moreno A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Via Bianchi 7-9, 25124, Brescia

²Regione Lombardia – D.G. Welfare U.O. Veterinaria, Piazza Città di Lombardia, 1, Milano

Summary

Wild birds could represent a natural reservoir of different pathogens, because of their biological and ethological characteristics. Among potentially dangerous pathogens for avian poultry, wild birds can transmit coronaviruses, in particular *Gamma* and *Deltacoronavirus*. These viruses mostly affect *Ciconiiformes*, *Pelecaniformes* and *Anseriformes*. Aim of the study is to investigate about diffusion and identification of *Coronavirus* genotypes within wild birds' population from Lombardy. During the biennium 2018-2019, 92 pools of faeces from *Anatidae* and 115 pools of viscera from birds of different species, have been collected and analysed through nested PCR. Results highlight a low prevalence of 3.1% (n=6 positive samples from *anatidae*) and phylogenetic analyses show the belonging of isolates to *Gammacoronavirus* group, demonstrating genetic diversity from infectious bronchitis virus (IBV). The low prevalence recorded is likely related to a low risk of transmission of Coronavirus to avian poultry. However, circulation among bird belonging to different orders, besides *Anseriformes*, should be deepened. Indeed, viscera could not represent the ideal biological matrices to isolate *Coronavirus*, thus an underestimation of this infection in wild bird cannot ruled out.

INTRODUZIONE

Gli uccelli selvatici rappresentano spesso il serbatoio naturale di patogeni di diversa natura. Il motivo risiede sicuramente nella grandissima varietà di specie conosciute, ma soprattutto nelle loro caratteristiche etologiche. La capacità di percorrere lunghe tratte migratorie e la formazione di grandi assembramenti durante gli spostamenti e nelle zone di sosta, permette la veloce diffusione e trasmissione di agenti patogeni sia a livello intraspecifico che interspecifico, anche in vaste aree geografiche. In queste caratteristiche risiede l'importanza del monitoraggio sanitario di tali specie, soprattutto in un'ottica di prevenzione riguardo all'introduzione di patologie potenzialmente zoonosiche e dannose per l'attività zootecnica avicola (Milek et al. 2018). Sicuramente per quest'ultima l'esempio più eclatante è rappresentato dall'influenza aviaria, ma negli ultimi anni si è posta una maggiore attenzione anche ad altri agenti virali in grado di provocare ingenti perdite economiche negli allevamenti. E' il caso dei virus appartenenti alla famiglia *Coronaviridae*, tra i quali riveste particolare importanza il virus della bronchite infettiva (IBV). Al momento i coronavirus sono distinti in 4 generi: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e il recente *Deltacoronavirus* (Chu et al, 2011). I primi due generi sono riferibili ai mammiferi, mentre *Gamma* e *Deltacoronavirus* risultano spesso associati agli

uccelli, che ne rappresentano il maggiore serbatoio, ma sono inoltre stati identificati in alcuni mammiferi marini e carnivori e nei suini in Asia (Dong et al, 2008; Mihindikulasuriya et al, 2008; McCluskey et al, 2016). Sono virus caratterizzati da un elevato tasso di mutazione e ricombinazione durante le fasi di replicazione, e quindi frequentemente soggetti alla formazione di nuove varianti genotipiche. Tali modifiche, oltre a incidere su virulenza e tropismo, potrebbero permettere ai diversi stipiti di adattarsi più facilmente a nuove specie (Woo et al, 2006). Studi precedenti hanno dimostrato come negli uccelli le infezioni da *Gamma* e *Deltacoronavirus* siano generalmente caratterizzate da un andamento asintomatico, permettendo l'insorgenza di alcuni endemismi all'interno di determinate popolazioni aviarie (Chu et al, 2011). Gli ordini maggiormente interessati da tale infezione sono *Ciconiiformes*, *Pelecaniformes* e *Anseriformes*, e generalmente si osserva una prevalenza maggiore di *Gammacoronavirus*. L'infezione da parte di entrambi i generi virali è stata osservata solo negli anseriformi, e, al momento, i dati supportano l'ipotesi che le altre specie possano infettarsi solo con uno dei due generi (Chu et al, 2011). Scopo del lavoro è rilevare la prevalenza di coronavirus sia nella popolazione di anatidi, sia in specie di uccelli selvatici provenienti da diverse aree geografiche della Lombardia; definire i genotipi circolanti al fine di approfondire il ruolo epidemiologico dell'avifauna nella diffusione di tali virus.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel corso del 2018, fino a marzo del 2019, sono stati analizzati 191 campioni fecali di anatidi raccolti dal terreno, raggruppati in 92 pool e 115 pool di visceri (encefalo, trachea, polmone, cuore, milza, rene, intestino) provenienti da volatili selvatici. Tali campioni sono stati originariamente conferiti presso l'IZSLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna) per le analisi inerenti il piano di monitoraggio dell'Influenza aviaria e del virus della West Nile. Nello specifico i campioni fecali rientravano in un programma di monitoraggio all'interno di parchi e aree protette, per lo più delle province di Bergamo, Brescia, Cremona, Lecco, Lodi, Milano, Monza-Brianza e Pavia. Le carcasse invece, provenivano dai centri di recupero degli animali selvatici situati a Vanzago (MI) e Valpredina (BG), a eccezione di una carcassa di Germano reale rinvenuta in provincia di Brescia. L'elenco e il dettaglio della provenienza delle specie analizzate è riportato nella tabelle 1, 2 e nel grafico 1.

PROVINCIA	NUMERO POOL	NUMERO CAMPIONI ANALIZZATI
Bergamo	9	9
Brescia	13	65
Cremona	30	52
Lecco	10	10
Lodi	3	3
Monza-Brianza	24	40
Milano	1	10
Pavia	2	2
TOT	92	191

Tab.1: Numero e provenienza dei pool e dei campioni di feci analizzati.

SPECIE	NUMERO CAMPIONI	SPECIE	NUMERO CAMPIONI
Airone cenerino	11	Germano reale	2
Airone guardabuoi	2	Gheppio	13
Allocco	3	Gufo comune	5
Assiolo	3	Ibis sacro	1
Astore	4	Merlo	1
Barbagianni	1	Nibbio	1
Beccaccia	1	Nitticora	1
Cigno	6	Picchio verde	2
Civetta	13	Piccione	2
Colombaccio	4	Pispola	1
Cornacchia grigia	2	Poiana	14
Falco lodolaio	1	Sparviere	8
Folaga	2	Tortora	2
Gabbiano comune	4	Upupa	1
Gabbiano reale	1	TOT	115

Tab.2: Numero dei campioni di visceri analizzati per le diverse specie aviarie.



Graf.1: Numero campioni di visceri analizzati provenienti dai CRAS della Valpre-

dina e di Vanzago.

Indagini molecolari e filogenetiche

I campioni sono stati omogenati in proporzione 1:10 con PBS addizionato dell'1% di penicillina e streptomicina, e del 10% di glicerina. Dopo centrifugazione a 3.750 rpm per 15 minuti, il surnatante è stato prelevato per effettuare l'estrazione dell'RNA tramite l'utilizzo di QIA Symphony come da istruzioni. L'RNA estratto è stato sottoposto a una PCR nested in grado di identificare tutti i generi di *Coronavirus*. È stato amplificato un frammento di 440 bp del gene codificante per l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) utilizzando primer e ciclo termico indicati da Chu et al (2011).

Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti a elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con sequenze presenti in GenBank, mediante allineamento con programma ClustalW. L'albero filogenetico maximum likelihood basato sul sequenziamento parziale del gene RdRp è stato eseguito utilizzando il software IQtree e il modello TN+F+G4 calcolato con Model Finder con un bootstrap di 1000 repliche.

RISULTATI

La PCR ha evidenziato la positività di 9 campioni fecali, dei quali però solo 6 sono stati confermati al sequenziamento riportando quindi una prevalenza del 3,1%. I campioni positivi provenivano dalle province di Cremona (n=3), Brescia (n=2) e Bergamo (n=1). Una sequenza relativa a un campione proveniente da Lecco è risultata invece mista. I campioni di visceri provenienti dai centri di recupero della fauna selvatica sono risultati tutti negativi.

Le analisi filogenetiche hanno confermato l'appartenenza delle sequenze isolate al gruppo *Gammacoronavirus* (vedi immagine 1).



Immagine 1: Albero filogenetico basato sulle sequenze parziali del gene RdRp

DISCUSSIONE

I dati emersi in tale studio mettono in evidenza una bassa prevalenza di *Coronavirus*, rilevati peraltro solo nella popolazione di anatidi esaminata. Precedenti studi effettuati, sia in Europa che in altri continenti, evidenziano un'elevata eterogeneità nelle prevalenze rilevate, senza evidenziare particolari pattern di positività nelle specie studiate. Indagini condotte in Cina, Scandinavia e Australia, infatti, riportano valori di prevalenza intorno al 15-18% (Chu et al, 2011; Wille et al, 2016;

Chamings et al, 2018), discostandosi molto dai valori riportati invece in altri paesi asiatici o europei, dove le prevalenze si attestano al di sotto del 3% (Hughes et al, 2009; Kim et al, 2014; A Rohaim et al, 2019). Valori intermedi sono invece registrati per esempio in Madagascar e nella zona della Beringia, dove la prevalenza risulta inferiore del 10% nell'avifauna (Muradrasoli et al, 2010; de Sales Lima et al, 2015). Tali studi confermano una maggiore suscettibilità all'infezione da parte degli ordini *Anseriformes*, *Charadriiformes* e *Pelecaniformes*. Nel nostro studio sono risultati positivi esclusivamente campioni provenienti da anatidi avvalorando quanto già noto da bibliografia. Il fatto che le feci siano state raccolte da terra, non esclude completamente la possibilità che nel campione possano esserci tracce di feci provenienti anche da altre specie; sebbene le altre specie analizzate siano risultate negative evidenziando una probabile minore suscettibilità all'infezione. Ipotesi supportata dalla bassissima prevalenza riscontrata anche in altri studi in ordini diversi come, per esempio, *Passeriformes* e *Galliformes* (A Rohaim et al, 2019). Tuttavia la negatività di tutti i campioni di visceri potrebbe indicare una natura non idonea della matrice esaminata, sottostimando di fatto la prevalenza in tali specie. Successivamente a questa fase di screening sarebbe opportuno ampliare il numero dei soggetti testati, utilizzando la matrice fecale come ulteriore conferma di questo andamento.

Le analisi filogenetiche evidenziano l'appartenenza di tutte le sequenze isolate al gruppo di *Gammacoronavirus*. È possibile evidenziare una debole corrispondenza tra i ceppi isolati e le zone di provenienza: ceppi isolati nella medesima area di studio presentano maggiore vicinanza genetica rispetto ai ceppi provenienti da altre zone. Questo aspetto in particolare si può apprezzare per le due sequenze provenienti dal Parco Oglio Nord (Cremona) e le due provenienti dal lago d'Iseo (Brescia). Si potrebbe quindi ipotizzare che, per quanto si tratti di uccelli migratori, le sub-popolazioni campionate siano rappresentate da gruppi di animali pseudo-stanziali; in grado di avere un periodo di contatto con altri individui sufficiente per consentire la trasmissione virale.

Nonostante le sequenze analizzate rientrino nel gruppo *Gammacoronavirus*, è interessante osservare come siano posizionati in un sub-clade diverso da quello in cui sono riportati i ceppi di bronchite infettiva (IBV). Il riscontro di virus geneticamente correlati a ceppi vaccinali di IBV, all'interno di popolazioni di uccelli selvatici, ha portato alla luce l'ipotesi che questi potessero fungere sia da potenziale vettore asintomatico, che da serbatoio di tale infezione, soprattutto per gli allevamenti avicoli (Hughes et al, 2009). All'interno delle popolazioni selvatiche il virus potrebbe inoltre subire delle mutazioni in fase di replicazione in grado di far emergere nuove varianti, rendendo quindi parzialmente o totalmente inefficaci i vaccini in uso (Milek et al, 2018).

I dati emersi nel presente studio evidenziano sicuramente una bassa prevalenza di *Coronavirus* nelle popolazioni studiate, e al contempo l'assenza di genotipi riferibili a IBV. Tuttavia, anche in considerazione dei limiti evidenziati da tale studio nell'utilizzo di matrici biologiche probabilmente inadatte, sarebbe opportuno approntare un ulteriore campionamento per poter confermare con maggiore certezza i dati preliminari.

BIBLIOGRAFIA

1. A Rohaim M, F El Naggar R, M Helal A, M Bayoumi M, A El-Saied M, A Ahmed K, Z Shabbir M and Munir M. (2019). Genetic diversity and phylodynamics of avian coronaviruses in Egyptian wild birds. *Viruses*. Jan;11(1):57.
2. Chamings A, Nelson TM, Vibin J, Wille M, Klaassen M and Alexandersen S. (2018) Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Scientific reports*. Apr 13;8(1):5980.
3. Chu DK, Leung CY, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tsemay MT, Guan Y, Peiris JS and Poon LL. (2011) Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of virology*. Dec 1;85(23):12815-20.
4. de Sales Lima FE, Gil P, Pedrono M, Minet C, Kwiatek O, Campos FS, Spilki FR, Roehe PM, Franco AC, Maminiaina OF and Albina E. (2015). Diverse gammacoronaviruses detected in wild birds from Madagascar. *European journal of wildlife research*. Aug 1;61(4):635-9.
5. Dong BQ, Liu W, Fan XH, Vijaykrishna D, Tang XC, Gao F, Li LF, Li GJ, Zhang JX, Yang LQ and Poon LL. (2007). Detection of a novel and highly divergent coronavirus from Asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China. *Journal of virology*. Jul 1;81(13):6920-6.
6. Hughes LA, Savage C, Naylor C, Bennett M, Chantrey J and Jones R. (2009). Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerging infectious diseases*. Jul;15(7):1091.
7. Kim HR and Oem JK. (2014). Surveillance of avian coronaviruses in wild bird populations of Korea. *Journal of wildlife diseases*. 2014 Oct;50(4):964-8.
8. McCluskey BJ, Haley C, Rovira A, Main R, Zhang Y and Barder S. (2016). Retrospective testing and case series study of porcine delta coronavirus in US swine herds. *Preventive veterinary medicine*. Jan 1;123:185-91.
9. Mihindukulasuriya KA, Wu G, Leger JS, Nordhausen RW and Wang D. (2008) Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *Journal of virology*. May 15;82(10):5084-8.
10. Miłek J and Blicharz-Domańska K. (2018). Coronaviruses in avian species—review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *Journal of veterinary research*. Sep 1;62(3):249-55.
11. Muradrasoli S, Bálint Á, Wahlgren J, Waldenström J, Belák S, Blomberg J and Olsen B. (2010) Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the Bering Strait area (Beringia). *PLoS One*. Oct 29;5(10):e13640.
12. Wille M, Muradrasoli S, Nilsson A and Järhult JD. (2016). High prevalence and putative lineage maintenance of avian coronaviruses in Scandinavian waterfowl. *PloS one*. Mar 3;11(3):e0150198.
13. Woo PC, Lau SK, Yip CC, Huang Y, Tsoi HW, Chan KH and Yuen KY. (2006). Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. *Journal of virology*. Jul 15;80(14):7136-45.



STUDIO DELL'EFFETTO FILIERA SULL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI QX IN ITALIA

Tucciarone C.M.¹, Franzo G.¹, Legnardi M.¹, Massi P.², Tosi G.², Trogu T.³, Moreno A.³, Ceruti R.⁴, Pesente P.⁵, Ortali G.⁵, Gavazzi L.⁴, Cecchinato M.¹

¹ *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università di Padova, Legnaro (PD), Italia.*

² *Sezione di Forlì, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna, Forlì Cesena (FC), Italia.*

³ *Dipartimento di Virologia, Sezione di Brescia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna, Brescia (BS), Italia.*

⁴ *Gesco sca, Cazzago San Martino (BS), Italia.*

⁵ *Laboratorio Tre Valli, San Michele Extra (VR), Italia.*

Summary

Infectious bronchitis is one of the main health problems in poultry and its epidemiology can be quite heterogeneous. In Italy, QX genotype (lineage GI-19) is considered the major field strain and different control strategies have been implemented to limit its impact, further shaping IB variability. The present study aimed to compare the epidemiology of QX in two different Italian integrated supply chain, namely A and B, as particular/separate determinants, using phylogenetic and phylodynamic approaches on the S1 hypervariable region of QX sequences collected between 2012 and 2016. The two integrated productive systems appeared to be quite distinct, except for some strains which seem to have spread from A to B, potentially by intermediate passages in a third chain, which was estimated by the models to justify the acquired variability but can be plausible considering the Italian production and overlapping distribution of the farms. The population dynamics of QX in the two chains reflected an overall increasing trend, even though less sudden and more restrained in the supply chain A. This study shows the importance of the epidemiological monitoring and suggest once more how differences in management and control strategies can affect IBV variability.

INTRODUZIONE

La Bronchite infettiva (IB) è una patologia endemica ed estremamente diffusa nell'allevamento avicolo, specialmente se intensivo. Negli allevamenti positivi, anche se gestiti in maniera ottimale, è stata stimata una perdita di produttività del 3% rispetto ad allevamenti negativi (McMartin, 1993). Le caratteristiche del virus della bronchite infettiva (IBV) si riflettono nelle varie problematiche di questo patogeno come l'elevata morbilità, la grande efficienza di trasmissione, l'ampia variabilità genetica, le difficoltà diagnostiche, la scarsa cross-protezione tra i diversi ceppi e la conseguente difficoltà nell'individuare dei vaccini efficaci (Jordan, 2017). Di conseguenza, anche l'epidemiologia della Bronchite infettiva risulta inevitabilmente intricata, influenzata da numerosi fattori e condiziona a sua volta la scelta delle strategie di controllo e la loro efficacia.

La circolazione di IBV sul territorio italiano è stata ampiamente descritta, in risposta alla necessità di contenere il problema in una delle maggiori realtà produttive euro-

pee (6° paese per produzione di carne, 3° di uova) (<https://ec.europa.eu/agriculture/>), riportando uno scenario caratterizzato dall'identificazione di ceppi vaccinali Mass-like e 793B-like (Franzo et al., 2014) e di ceppi di campo Q1 (Franzo et al., 2018) e QX (Franzo et al., 2017), tra i più rilevanti, con differenti prevalenze nel tempo. L'importanza della conoscenza dell'epidemiologia locale è stata più volte messa in luce, in relazione all'interpretazione sia dell'effettivo ruolo di alcuni ceppi, come nel caso del 793B la cui frequenza si è drasticamente ridotta a seguito della sospensione dell'utilizzo di vaccini *793B-derived* (Franzo et al., 2014), sia dell'influenza della vaccinazione sulla dimensione della popolazione virale e degli *outbreak* clinici, come evidenziato per il QX (Franzo et al., 2016).

In questo contesto si inserisce il presente lavoro che ha avuto come obiettivo l'analisi di ulteriori elementi che possono condizionare l'epidemiologia di IBV, descrivendo per la prima volta l'effetto filiera sulla variabilità e la circolazione di ceppi QX, confrontando la popolazione e i flussi virali di due situazioni produttive separate.

MATERIALI E METODI

Per lo studio sono stati raccolti dei campioni provenienti da allevamenti avicoli di broiler e ovaiole in Italia, appartenenti a due filiere distinte. Per ciascun campione sono state registrate le informazioni inerenti alla filiera di appartenenza, la localizzazione dell'allevamento, la categoria produttiva e la data di campionamento. Dopo estrazione dell'RNA tramite kit commerciale NucleoSpin® 8/96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany), i campioni sono stati preliminarmente testati con una real-time RT-PCR commerciale per l'identificazione di IBV (Quantification of Avian Infectious Bronchitis Virus-IBV-kit; Genesig, Southampton, UK). I campioni positivi sono stati amplificati nella regione ipervariabile HVR3 con i primer XCE1-XCE2 (Cavanagh et al., 1999) e sequenziati con metodo Sanger con gli stessi *primer* utilizzati per la genotipizzazione, confrontandoli con le sequenze di riferimento pubblicate da Valastro et al. (2016) mediante analisi filogenetica. Per le analisi bioinformatiche sono stati selezionati solo i ceppi appartenenti al *lineage* GI-19, ovvero genotipo QX, e tutti i ceppi con 100% di identità con i ceppi vaccinali sono stati rimossi dal database. Al fine di ricostruire il passaggio di ceppi da una filiera all'altra e di stimare l'intensità di tali flussi, è stato utilizzato un metodo basato sulla *structured coalescent*, implementato in BEAST2. In estrema sintesi, questo approccio permette di suddividere la popolazione virale in una serie di *demi* o isole, ciascuno caratterizzato da una propria dimensione e connesso agli altri da un certo tasso di migrazione. L'utilizzo di sequenze di cui sia nota la data di campionamento e la ricostruzione delle relazioni filogenetiche fra queste, rende inoltre possibile la contestuale stima di diversi parametri inerenti alla genetica, all'origine temporale degli antenati (*time to most recent common ancestor*, tMRCA), all'evoluzione e alla storia demografica della popolazione virale considerata.

Nel presente studio, le sequenze di IBV ottenute sono state utilizzate per stimare, oltre ai tassi evolutivi, i tMRCA e le dinamiche di popolazione, la storia della migrazione dei virus fra le due filiere nel corso del tempo e i relativi tassi di migrazione. Consapevoli del fatto che altre filiere operino sul territorio italiano, è stata eseguita un'ulteriore analisi che includesse una filiera "fittizia", ossia un *deme* di cui si assumeva l'esistenza pur in assenza di sequenze disponibili. In questo modo è stato possibile includere nel modello di migrazione un ulteriore "attore", e valutarne l'eventuale ruolo di mediazione nell'introduzione di ceppi da una filiera all'altra, o fra allevamenti della stessa filiera.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati inclusi nello studio un totale di 377 ceppi QX, di cui 16 di origine vaccinale, provenienti da allevamenti distribuiti in Italia, appartenenti a due filiere (A e B) e raccolti nel periodo 2012-2016. Le restanti 361 sequenze sono state classificate come QX di campo: 135 sequenze provenivano dalla filiera A, mentre 226 dalla filiera B.

L'origine di IBV in Italia viene ricondotta ai primi anni del nuovo millennio, a seguito dell'introduzione dall'estero, probabilmente avvenuta nella filiera A (approssimativamente nel 2004 [2000-2010]), mentre la prima introduzione nella filiera B sembra essere avvenuta all'incirca nel 2009 [2007-2011]. L'analisi filodinamica ha permesso di stimare le dinamiche della popolazione nel corso del tempo nelle rispettive filiere. Sebbene questi metodi permettano di fare stime anche per periodi antecedenti ai primi campionamenti, queste finestre temporali si caratterizzano solitamente per una maggiore incertezza, specialmente nel caso di parametri complessi come la storia demografica. Per tale motivo vengono qui riportati i risultati a partire dal limite superiore del 95 *High Posterior Density* (HPD) della stima del tMRCA di ciascuna filiera.

Il confronto della dinamica di popolazione del genotipo QX nelle due filiere (Figura 1), mostra un andamento relativamente stabile nel caso della filiera A, caratterizzato da una lieve diminuzione nel periodo 2012-2015 rispetto al livello iniziale, cui è seguito un aumento della circolazione virale nella successiva fase e perdurato fino alla fine dello studio. Va tuttavia sottolineato che le oscillazioni menzionate nel valore medio della popolazione virale sono di lieve entità e in massima parte comprese all'interno dell'intervallo di confidenza degli altri momenti temporali considerati, evidenza che depone a favore di una popolazione virale sostanzialmente costante nel corso del tempo. La popolazione virale della filiera B si caratterizza invece per un andamento decisamente più altalenante. Sebbene la popolazione rimanga costante fino alla fine del 2013, una leggera riduzione precede invece una vistosa espansione fino all'inizio del 2015, a cui segue una progressiva riduzione fino al termine del periodo analizzato nello studio. È interessante notare come tale picco nella popolazione di IBV rifletta una variazione nella strategia vaccinale, originando alcuni mesi dopo l'interruzione della somministrazione di una vaccinazione Mass+793B, a favore del solo Mass. Similmente il rapido declino osservato a partire dal 2015 segue all'introduzione di un vaccino omologo nel programma vaccinale.

Nonostante le differenze osservate fra le 2 filiere, un certo parallelismo nei trend delle filiere A e B è comunque osservabile, essendo riscontrabile una tendenza all'aumento della circolazione virale a partire dagli ultimi mesi del 2014. Tale evidenza potrebbe quindi riflettere una generale maggiore pressione infettante sul territorio italiano, che potrebbe aver avuto esiti differenti in termini di intensità, potenzialmente in funzione di differenze strutturali o manageriali nelle 2 filiere.

La ricostruzione dell'albero filogenetico (Figura 2) mostra come le sequenze delle due filiere *clusterizzano* nettamente in due *clade* separate, con un'elevata variabilità entro filiera che progressivamente si accumula nel tempo. Tuttavia, un limitato numero di sequenze (i.e. 11) ottenute da campioni provenienti dalla filiera B sono classificati nella *clade* della filiera A, ad indicare come solo alcuni ceppi circolanti nella filiera A abbiano raggiunto la filiera B, continuando, in parte, a differenziar-

si. Nonostante gli elevati standard di biosicurezza e la netta separazione che caratterizzano i sistemi produttivi integrati italiani, la collocazione geografica degli allevamenti predispone ad una certa promiscuità, che inevitabilmente aumenta il rischio di diffusione e condivisione dei patogeni. In effetti, tutte le sequenze della filiera B che *clusterizzano* nella *clade* della filiera A sono originate da allevamenti localizzati nell'area ad alta densità di allevamento del Nord Italia.

Tuttavia, un'analisi limitata a due sole filiere, per quanto grandi, potrebbe non rispecchiare adeguatamente il reale scenario epidemiologico italiano. Un secondo albero (Figura 3) è stato quindi ricostruito tenendo in considerazione la presenza di un'ipotetica terza filiera, permettendo di collocare in uno scenario epidemiologico esterno parte dell'evoluzione dei ceppi circolanti. In effetti, l'introduzione nel modello di una filiera "fittizia", in grado di giustificare parte della variabilità osservata e di introdurre una potenziale terza tappa negli scambi e nei passaggi del virus, ha comportato un significativo cambiamento nello scenario stimato, in particolare per quanto concerne la filiera B. In effetti, molti degli eventi di introduzione di nuovi ceppi all'interno di questa filiera sembrerebbero riconducibili alla mediazione di altre filiere o allevamenti. Poiché nessuna imposizione è stata imposta nel modello circa l'esistenza di tali migrazioni e la loro intensità, la stima di questo pattern è frutto di un'interpretazione probabilistica, e quindi oggettiva, dei dati. Questa ricostruzione propone, come scenario più verosimile per spiegare la variabilità dei ceppi campionati nella filiera B, una loro evoluzione indipendente (almeno per tratti della storia evolutiva) in altri allevamenti, seguita da eventi di introduzione multipla. La robustezza di tali risultati appare confermata dall'assenza di queste dinamiche nella filiera A, dove l'evoluzione dei ceppi sembra essere essenzialmente avvenuta all'interno della stessa, con occasionali *spillover* verso altre filiere.

In modo concorde, le stime dei flussi virali (Figura 4) evidenziano come la terza filiera sia coinvolta in uno scambio di ceppi reciproco e relativamente intenso con la filiera B che, a sua volta, sembra ricevere un flusso virale dalla filiera A, la quale invece risulta più isolata e meno permeabile all'ingresso di ceppi provenienti dalle altre filiere. Nonostante il ruolo chiave ipotizzato per la terza filiera, la dimensione stimata della popolazione virale in essa circolante è molto ridotta e appare circa 1/6 della popolazione della filiera A e 1/18 della filiera B. La direzionalità dei flussi risulta quindi inaspettata, ma altri fattori come la localizzazione delle aziende, il management, la condivisione di mezzi di trasporto degli animali o del mangime, potrebbero contribuire alla diffusione del virus tra le filiere. È interessante notare, a supporto dell'attendibilità del modello, come le stime della dimensione dei diversi *demi*, seppur con un ovvio margine d'errore, ben ripropongano la suddivisione delle quote dell'avicoltura nazionale fra le diverse filiere. Ciononostante, il modello a tre filiere, trattandosi di una stima probabilistica, deve sicuramente essere interpretato con cautela. Tuttavia, le analisi effettuate evidenziano come, sebbene con una moderata frequenza, eventi di trasmissione fra filiere possano avvenire, specialmente nelle aree ad alta densità di allevamento come il Nord Italia. Risulta altresì evidente la necessità di una condivisione più ampia possibile dei dati disponibili circa l'epidemiologia molecolare di IBV, al fine di poter creare modelli quanto più attendibili possibili, che permettano un'accurata comprensione del suo comportamento e ne favoriscano il controllo.

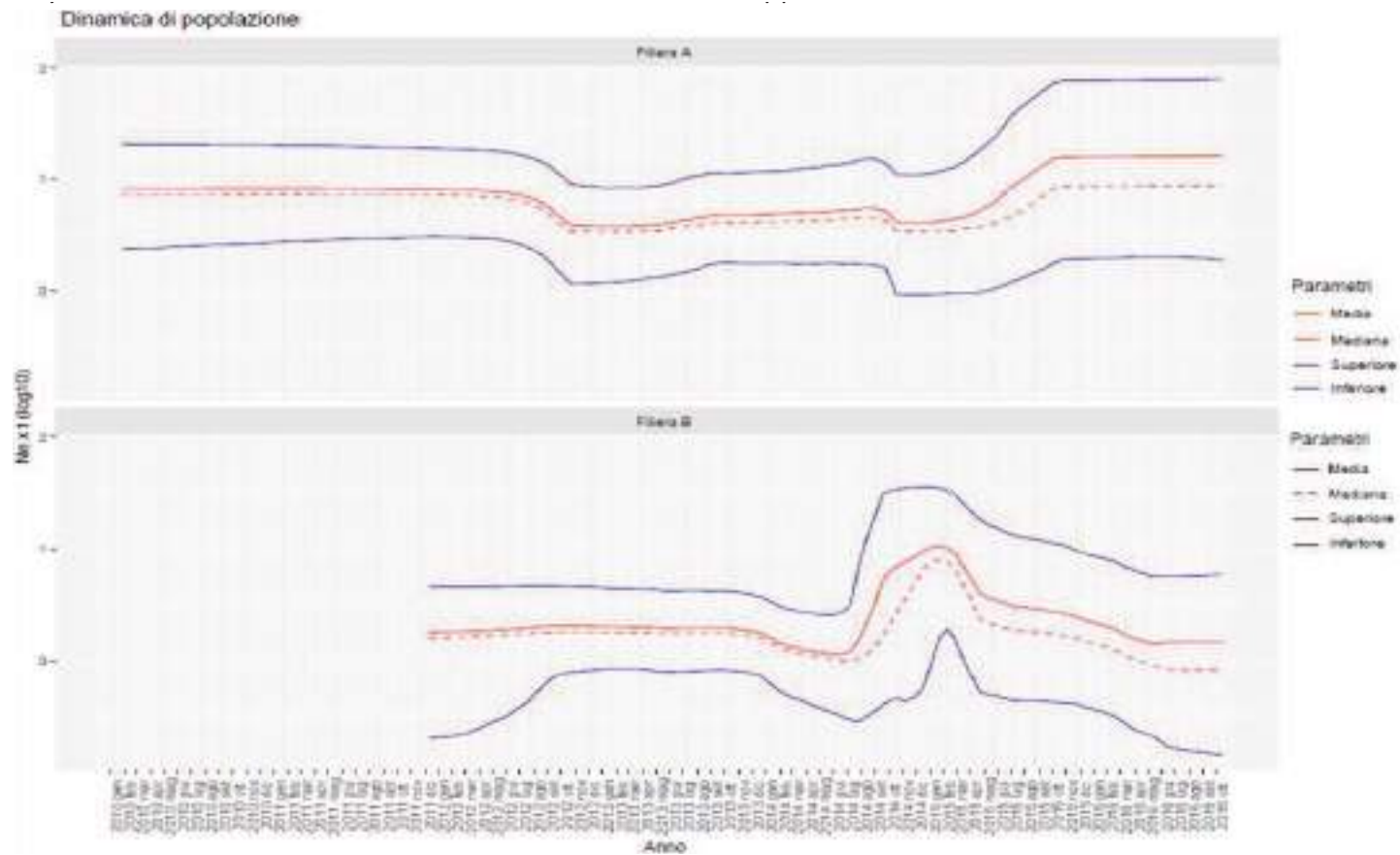


Figura 1: Bayesian skyline plot delle dinamiche di popolazione dei ceppi QX nelle filiere A (sopra) e B (sotto). Media, mediana e intervallo superiore e inferiore di 95HPD (*Highest Posterior Density*) della diversità genetica relativa (i.e. $Ne \cdot \tau$) sono rappresentati nel tempo.

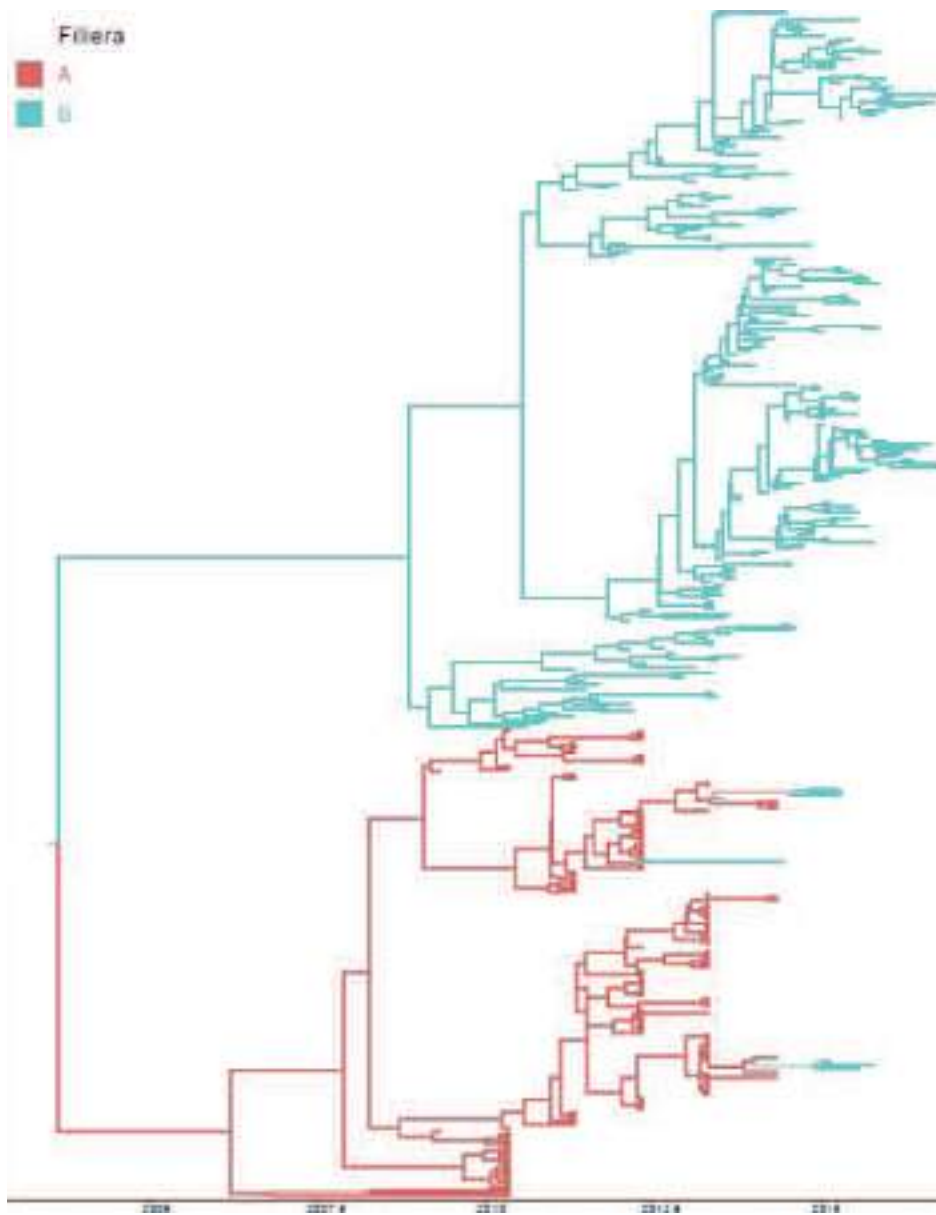


Figura 2: albero filogenetico con due filiere. Le sequenze provenienti dalle filiere A e B sono colorate in rosso e azzurro rispettivamente.

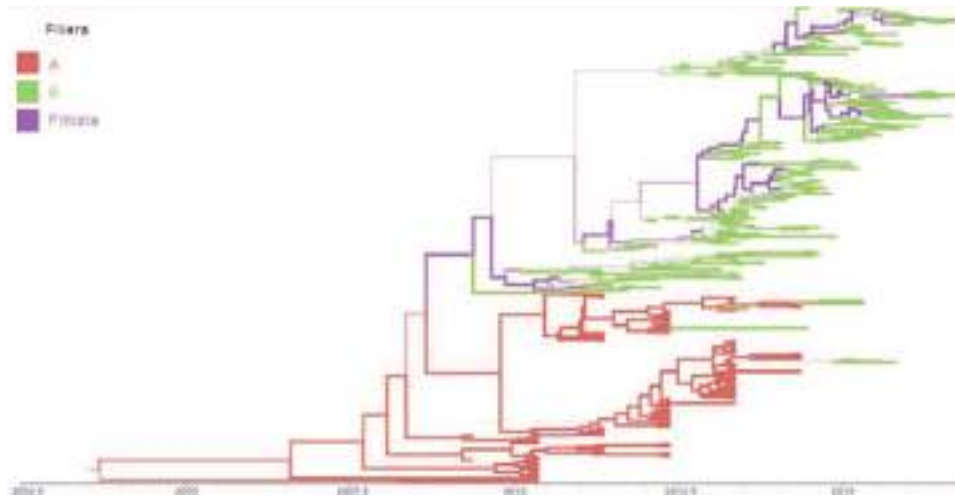


Figura 3: albero filogenetico con tre filiere. Le sequenze provenienti dalle filiere A e B sono colorate in rosso e verde rispettivamente, mentre il percorso evolutivo stimato nella filiera fittizia è rappresentato in viola e la probabilità della stima è indicata dallo spessore del ramo.

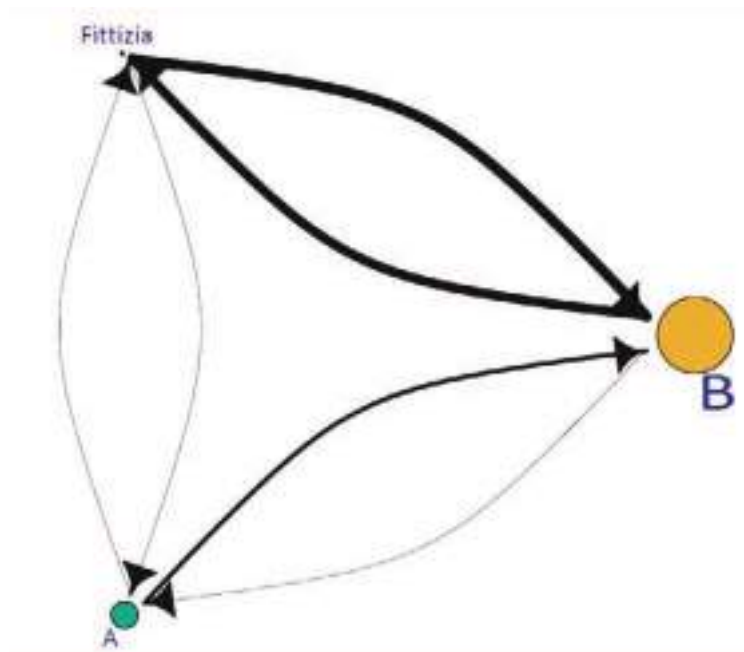


Figura 4: stima dei flussi virali tra le filiere. L'intensità del flusso è indicata dallo spessore della freccia, mentre la dimensione della popolazione virale della filiera è indicata dal diametro del cerchio che la rappresenta.

CONCLUSIONI

Questo studio mette in luce la circolazione di QX all'interno di due importanti filiere italiane e mostrando come la popolazione virale sia generalmente ben distinta, ad eccezione dell'introduzione di alcuni ceppi derivati dalla filiera A e potenzialmente da altre fonti nella filiera B. Le misure di biosicurezza e le modalità produttive che caratterizzano la filiera come flusso produttivo integrato e autosufficiente sembrano complessivamente garantire un adeguato isolamento e la protezione del proprio ambito epidemiologico, favorendo un'evoluzione relativamente indipendente dei rispettivi gruppi virali nel corso del tempo.

BIBLIOGRAFICA

1. Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E. and Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine*, 32(50), pp.6765-6767.
2. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Nofrarias, M., Biarnés, M., Cortey, M., Majó, N., Catelli, E. and Cecchinato, M., 2016. Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine*, 34(46), pp.5670-5676.
3. Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C.M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., Ciccozzi, M., Lavazza, A., Cecchinato, M. and Moreno, A., 2017. 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(9), p.e0184401.
4. Franzo, G., Cecchinato, M., Tosi, G., Fiorentini, L., Faccin, F., Tucciarone, C.M., Trogu, T., Barbieri, I., Massi, P. and Moreno, A., 2018. GI-16 lineage (624/I or Q1), there and back again: The history of one of the major threats for poultry farming of our era. *PLoS one*, 13(12), p.e0203513.
5. Jordan, B., 2017. Vaccination against infectious bronchitis virus: a continuous challenge. *Veterinary microbiology*, 206, pp.137-143.
6. McMartin, D.A., 1993. Infectious bronchitis. *Virus infections of vertebrates*. JB McFerran and MS McNulty, eds. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, the Netherlands, pp.249-275.

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO PER STUDIARE LA COCCIDIOSI AVIARIA *IN VITRO*

Tugnoli B.¹, Sangiovanni M.², Ghiselli F.², Felici M.², Fiorentini L.³, Parigi M.³, Tosi G.³, Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{2,4}, Massi P.³

¹ *Vetagro S.p.A., Via Porro, 2 – 42124 – Reggio Emilia (Italy)*

² *DIMEVET, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO), Italy*

³ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì, Forlì (FC), Italy*

⁴ *Vetagro, Inc., 116 W. Jackson Blvd Suite #320, 60604 Chicago (IL), USA*

Summary

Coccidiosis is one of the most common parasitic disease of poultry worldwide, caused by protozoa belonging to the genus *Eimeria*, that damage the host's intestinal mucosa, leading to loss of production, zootechnical performance decrease and also mortality.

Aim of this study was to set up a method to recover multi-species *Eimeria* oocysts from field samples and to reproduce the parasitic infestation *in vitro* on a cell model.

Starting from field samples (feces, litters, and intestinal contents) a multi-step protocol has been developed for the collection of multi-species *Eimeria* oocysts, sporulation, recovery of sporozoites, and set-up of *in vitro* infestations using Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells, known to be receptive to *Eimeria*. Real Time PCR was used to identify *Eimeria* species in the initial oocysts samples, to verify sporozoites collection, and to detect MDBK cells infestation. In conclusion, the elaborated method allowed to recover several species of *Eimeria* from field samples and to reproduce *in vitro* infestation on a cell model. As future applications, this protocol can be exploited to perform *in vitro* screening tests to select bioactive substances with anticoccidial properties.

INTRODUZIONE

La coccidiosi è una delle più comuni ed economicamente più importanti patologie del settore avicolo, causata da protozoi appartenenti al genere *Eimeria*. Tale patologia intestinale è caratterizzata da una forte riduzione delle performance di crescita degli animali con un impatto economico stimato in 2.5-3 miliardi di dollari di perdite ogni anno. Inoltre, il danno alla mucosa intestinale causato da *Eimeria* spp è considerato il principale fattore predisponente dell'enterite necrotica causata da *C. perfringens*, largamente ritenuta una delle principali minacce per l'industria avicola globale (Quiroz-Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015; Timbermont et al., 2011).

Una corretta gestione dell'allevamento è fondamentale per il controllo della patologia, ma data la sua frequenza e la sua diffusione sono necessari una prevenzione ed un controllo di tipo farmacologico. Tali trattamenti prevedono l'utilizzo, sotto regolamentazione, di farmaci anticoccidici (coccidiostatici), solitamente alternati a programmi di vaccinazione nei periodi estivi (Quiroz-

Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015).

In particolare in Europa, l'intento è quello di cessare gradualmente l'utilizzo di coccidiostatici, per cui è di grande interesse lo sviluppo di prodotti alternativi da introdurre anche attraverso la dieta dell'animale. Lo studio della coccidiosi si basa principalmente su studi *in vivo* con animali sottoposti a challenge con *Eimeria*, mentre gli studi *in vitro* sono pochi a causa di una difficile standardizzazione del protocollo. Inoltre, per recuperare le oocisti da cui partire per eseguire la fase *in vitro*, solitamente viene utilizzato l'animale come incubatore. Dato l'interesse nello sviluppare nuove sostanze anticoccidiche e in accordo con i principi delle "3R" (Replacement, Reduction, Refinement), secondo cui i metodi alternativi *in vitro* sono da preferire, è opportuno elaborare un metodo *in vitro* che possa permettere test di screening di molecole bioattive per valutarne le proprietà anticoccidiche.

L'obiettivo di questo studio è l'elaborazione di un protocollo di recupero di oocisti di *Eimeria* da campioni di campo e la riproduzione dell'infestazione *in vitro* su un modello cellulare.

MATERIALI E METODI

La fase sperimentale di questo studio è stata svolta presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) – sezione di Forlì e presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) - servizio Produzioni Animali e Sicurezza Alimentare" (SPASA) dell'Università di Bologna.

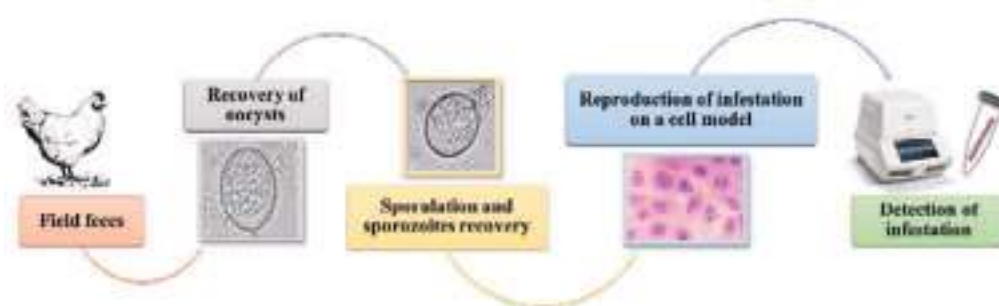


Figura 1 – Disegno sperimentale

In Figura 1 è presentato lo schema sperimentale: in breve, campioni di campo (feci, lettiera o contenuti intestinali) sono stati processati per recuperare le oocisti, su queste è stata messa a punto procedura per consentire la sporulazione e la raccolta degli sporozoi in grado di infestare le cellule di rene bovino (MDBK - Madin-Darby Bovine Kidney). Tale infestazione è stata monitorata con tecniche di biologia molecolare.

Il protocollo è stato elaborato dopo un'accurata ricerca bibliografica e, in particolare, la guida europea "*Biotechnology – Guidelines on techniques in coccidiosis research*" (Eckert et al., 1995) è stata utilizzata come riferimento in base al quale adattare i metodi.

Campionamento

Sono stati utilizzati campioni di feci, lettieri e contenuti intestinali conferiti presso l'IZSLER – sezione di Forlì nel periodo “aprile 2018-luglio 2019”, provenienti da animali con evidenti sintomi da coccidiosi.

Messa a punto del protocollo di raccolta oocisti, sporulazione e raccolta sporozoit

Il campione iniziale è stato omogenato, filtrato e lavato per allontanare i vari detriti. Le oocisti sono state recuperate aggiungendo una soluzione satura di sale che permette a queste di galleggiare sulla superficie del liquido, così da facilitarne il prelievo (flottazione). Per consentire la sporulazione, le oocisti sono state risospese in una soluzione di bicromato di K (2%) e lasciate a T ambiente (all'aria), con verifica dell'andamento della sporulazione settimanale, tramite visualizzazione e conta al microscopio con camera di Burkner delle oocisti totali e di quelle sporulate. Una volta raggiunto un livello di 70-80% di sporulazione, le oocisti sono state sterilizzate con ipoclorito di sodio poi, per il recupero degli sporozoit, è stato ricreato quanto avviene nell'apparato digerente dell'animale: prima è stata effettuata una rottura meccanica con biglie di vetro e omogeneizzatore Tissue Lyser (Qiagen) cui è seguita una digestione enzimatica utilizzando un cocktail di tripsina, sali biliari, pancreatina, MgCl₂ (excistazione). Gli sporozoit ottenuti sono stati poi utilizzati per le infestazioni delle cellule MDBK.

Prove di infestazione su cellule di rene bovino (MDBK)

Gli sporozoit ottenuti sono stati utilizzati per allestire delle infestazioni di cellule epiteliali di rene bovino (Madin-Darby Bovine Kidney - MDBK), comunemente utilizzate come cellule ospite per infestazioni da *Eimeria* (Tierney & Mulcahy, 2003). Come primo step, sono state fatte delle prove di semina delle MDBK in piastre 24-wells per individuare la concentrazione necessaria per ottenere un monostrato in semi-confluenza, adatto a ricevere l'infestazione con gli sporozoit. Inoltre, sono state fatte delle prove incubando le cellule con il medium di excistazione per verificare che eventuali residui non andassero ad alterare le cellule in termini di morfologia e proliferazione. Le MDBK sono state coltivate a 37 °C e 5% di CO₂ in un medium composto da DMEM con 1% L-glutamina, 10% FBS (siero fetale bovino), 1% penicillina (100 U/mL), 1% streptomicina (100 µg/mL) e 1% amfotericina B (0.25 µg/mL). Varie prove di infestazione sono state allestite con differenti concentrazioni sporozoit (10⁴-10⁵ per well) e diversi tempi di incubazione (24 o 48 h).

Analisi di biologia molecolare – Real Time PCR

La Real Time PCR è stata utilizzata come tecnica per identificare le specie di *Eimeria* presenti nei campioni iniziali di oocisti, per verificare la raccolta degli sporozoit dopo i passaggi di sporulazione ed excistazione e per monitorare l'infestazione delle cellule MDBK. Il DNA è stato estratto dai campioni di oocisti, sporozoit e cellule con il kit NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) seguendo le istruzioni e, per quanto riguarda le oocisti, è stato aggiunto un pre-trattamento del campione per favorire la rottura della parete tramite shock termico. È stata utilizzata una reazione con sybr green e primers specie-specifici per la ricerca di 5 specie di *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella*. È

stato inoltre cercato anche il gene del citocromo B bovino (Cyt B) come controllo positivo della reazione condotta sulle cellule MDBK (Tabella 1).

Tabella 1 – Primers usati per la Real Time PCR

Specie	Gene	Sequenza primer (5'→3')	Prodotto (bp)	Accession nr.	Referenza
<i>E. acervulina</i>	ITS-1	F AACCTGACTGTGCAAGCATC R ATCATAGACAGCCGTGCCAG	166	AF026384	(Kawahara et al. 2008)
<i>E. brunetti</i>	ITS-1	F TTGCGTAAATAGAGCCCT R CATGCAGAAAACCTCCAAAAG	148	AF026383	(Kawahara et al. 2008)
<i>E. maxima</i>	ITS-1	F GTTGCGTAAATAGAGCCCTCT R ACCAATGCAGAACGCTCCAG	152	AF065094	(You 2014)
<i>E. necatrix</i>	ITS-1	F GCAGTCGTTCTTGGGTGT R TGCTCACGCCATACTAC	148	AF026385	(Kawahara et al. 2008)
<i>E. tenella</i>	ITS-1	F TGGAGGGGATTATGAGAGGA R CAAGCAGCATGTAACGGAGA	147	AF026388	(Kawahara et al. 2008)
<i>Bos Taurus</i>	Cyt B	F CGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGT R GGATTGCTGATAAGAGGTTGGTG	116	D34635	(Dooley et al. 2004)

In breve, la reazione è stata allestita sul sistema CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) in un volume finale di 10 µL (contenente 5 µL di iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, 500 nM di forward e reverse primer e 2 µL di DNA per 10 ng totali). Il ciclo di amplificazione prevedeva: denaturazione a 95 °C per 3 minuti, 40 cicli a 95°C per 10 secondi e a 60 °C per 30 secondi (annealing ed extension), seguito da una curva di Melting per escludere la presenza di prodotti aspecifici.

RISULTATI

Messa a punto del protocollo di raccolta oocisti, sporulazione e raccolta sporozoiti
Complessivamente sono stati processati 31 campioni: 9 campioni di feci, 17 campioni di lettiera e 5 campioni di contenuto intestinale. Tali campioni hanno presentato una grande variabilità in termini di contenuto di oocisti, tempi di sporulazione e percentuale di sporulazione. In particolare:

- Campioni di feci (tot. 9): sporulazione di 50% ± 27% in 25 ± 13 giorni
- Campioni di lettiera (tot. 17): sporulazione di 40% ± 25% in 20 ± 9 giorni
- Campioni di contenuto intestinale (tot. 5): sporulazione di 60% ± 28% in 15 ± 5 giorni

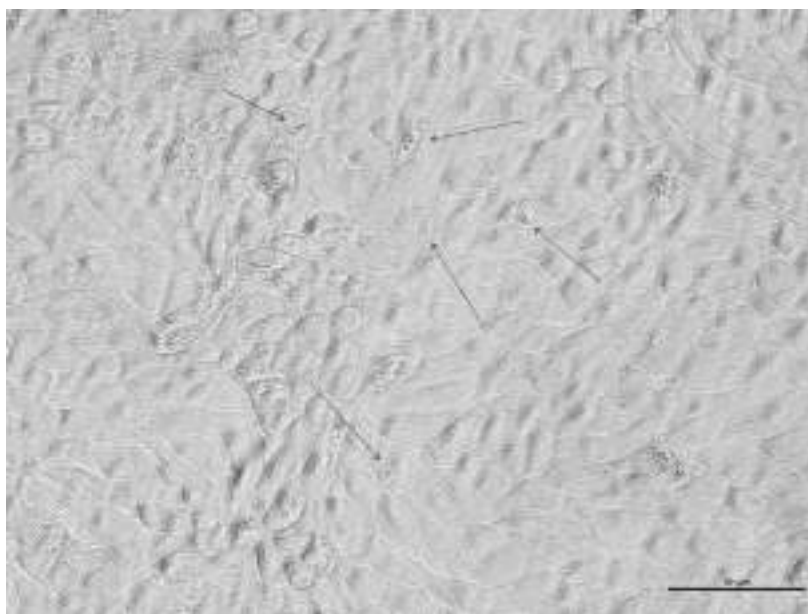
Per proseguire con i passaggi successivi, sono stati selezionati i campioni con un livello di sporulazione del 70-80%. Per permettere l'excistazione e il recupero degli sporozoiti, è stato messo a punto un doppio passaggio di rottura meccanica e

digestione enzimatica. Sono stati confrontati differenti metodi di omogeneizzazione (in termoblocco vs Tissue Lyser), differenti buffer (DPBS, H₂O distillata, buffer di lisi del kit Nucleospin), differenti biglie di vetro, differenti medium di digestione (enzimi, sali), tempi e temperature di incubazione (41°C vs 37°). Le condizioni migliori sono risultate: omogeneizzazione in H₂O distillata, con biglie di vetro (0.5 mm diametro), a T ambiente, in Tissue Lyser, seguita da digestione enzimatica a 39°C con un cocktail di tripsina, sali biliari, pancreatina e MgCl₂. In questo modo, è stato possibile ottenere sporozoi con un'efficienza del 90-95% rispetto al numero teorico calcolato.

Prove di infestazione su cellule di rene bovino (MDBK)

Le prime prove di coltura delle MDBK hanno permesso di individuare la densità di semina ottimale (10⁵ cellule/well di 24-w) per ottenere in 48 h uno monostrato al 75-80% di confluenza. Inoltre, le MDBK sono risultate tolleranti, in termini di morfologia e proliferazione, al medium di excistazione utilizzato per recuperare gli sporozoi. Le prove di infestazione hanno rivelato che gli sporozoi ottenuti come precedentemente descritto, inoculati ad una dose di 10⁵ sporozoi per well, sono stati in grado di penetrare nelle cellule MDBK come evidenziato dalla loro localizzazione intracellulare dopo 24 ore di infestazione (Figura 2).

Figura 2 – Infestazione di cellule epiteliali di rene bovino (MDBK) con sporozoi di *Eimeria* multi-specie.



Le frecce indicano gli sporozoi intracellulari dopo 24 ore di infestazione (ingrandimento 400X)

Analisi di biologia molecolare – Real Time PCR

Per validare la reazione di Real Time PCR è stata innanzitutto verificata l'efficienza di amplificazione dei primers per le varie specie di *Eimeria* e per il gene Citocromo B bovino, ottenendo dei valori soddisfacenti di 90-98%. È stato possibile estrarre con successo il DNA sia dalle oocisti (inserendo un iniziale pre-trattamento per lisare la parete), sia dagli sporozoitii, sia dalle cellule MDBK infestate. Nella maggior parte dei campioni sono state trovate *E. tenella*, *E. acervulina* ed *E. brunetti*; nelle prove di infestazione il DNA di *Eimeria* è stato trovato sia nelle oocisti iniziali, sia negli sporozoitii utilizzati come inoculo, sia nelle cellule MDBK post-infestazione indicando che la preparazione del campione di sporozoitii e l'infestazione sono avvenute con successo.

DISCUSSIONE

Questo studio si prefiggeva l'obiettivo di mettere a punto un protocollo di recupero di oocisti di *Eimeria* spp. da campioni di campo e la riproduzione dell'infestazione *in vitro* su un modello cellulare. Come riferimento è stata utilizzata la guida europea "*Biotechnology – Guidelines on techniques in coccidiosis research*", la quale si riferisce principalmente *E. tenella*, mentre tale metodo è stato adattato per più specie di *Eimeria*. Infatti, mentre i pochi studi *in vitro* sulla coccidiosi presenti in letteratura riproducono infestazioni mono-specie (soprattutto con *E. tenella* o *E. maxima*), in questo studio, partendo da un campione di campo, si è potuto riprodurre un'infestazione multi-specie, condizione appunto più simile alla realtà di campo. Per questo scopo, la Real Time PCR è stata utilizzata come tecnica di "detection" per identificare le specie di *Eimeria* nel campione iniziale di oocisti e negli sporozoitii recuperati col metodo elaborato, infine per verificare l'infestazione sul modello cellulare. Rispetto alla classica valutazione al microscopio, tale tecnica molecolare si è rivelata molto utile per poter discriminare tra le diverse specie di *Eimeria* e dare un'indicazione sulla loro capacità di infestare.

CONCLUSIONI

Nell'ottica della ricerca di strategie alternative ai farmaci coccidiostatici e nel rispetto dei principi delle "3R" inerenti al benessere animale e ad una sperimentazione animale etica, il protocollo messo a punto in questo studio potrà essere utilizzato per fare test di screening *in vitro* di molecole bioattive ad attività anticoccidica.

BIBLIOGRAFIA

1. Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD and HM Brown (2004). Detection of Meat Species Using TaqMan Real-Time PCR Assays. *Meat Science* 68(3):431–438.
2. Eckert J, Braun R, Shirley MW and P Coudert (1995). *Biotechnology, Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. Luxembourg: European Commission.
3. Kawahara F, Taira K, Nagai S, Onaga H, Onuma M and T Nunoya (2008). Detection of five avian *Eimeria* species by species-specific real-time polymerase chain reaction assay. *Avian Dis.* 52(4):652-656.
4. Quiroz-Castaneda RE and E Dantan-Gonzalez. (2015). Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 430610, 11 pages.
5. Tierney J and G Mulcahy. (2003) Comparative Development of *Eimeria Tenella*

- (Apicomplexa) in Host Cells in Vitro. *Parasitology Research* 90(4): 301–304.
6. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R and F Van Immerseel (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40(4):341-347.
 7. You MJ (2014). Detection of Four Important *Eimeria* Species by Multiplex PCR in a Single Assay. *Parasitology International* 63(3): 527–532.



ATTI DEL IV SIMPOSIO SCIENTIFICO

POSTER

Bologna, 22 Novembre 2019



EFFICACIA IN CAMPO DELLA VACCINAZIONE PER IL CONTROLLO DELLE ALTERAZIONI APICALI DELL'UOVO CAUSATE DA *MYCOPLASMA SYNOVIAE*

Bassi E.¹, Burzoni G.², Careno S.¹

¹ *Fatro S.p.A.*

² *Libero Professionista*

Summary

Mycoplasma synoviae is responsible for important economic losses in poultry. It causes not only joint and respiratory subclinical lesions, but also damages on egg production. Many cases are reported of connection between the infection by *Mycoplasma synoviae* and Eggshell Apex Abnormalities (EAA). The efficacy of vaccination with an inactivated vaccine (MS-VAC- Fatro) in reducing this kind of lesions was evaluated in the field, compared to a live vaccine. A farm of commercial layers was identified with history of EAA clinical forms in the second half of the egg deposition period. Two distinct groups of birds of about 15.000 subjects each were vaccinated respectively with MS-VAC (group V) and a live vaccine (group H). A third one was kept as a sentinel group (group S- 500 subjects). Serological and clinical analysis were carried out during the rearing and deposition phase. *M.s.* clinical signs on birds and EAA damages on production by field *Mycoplasma synoviae* were evaluated. Sentinels became positive for *M.s.* antibodies from week 23 of age and signs of EAA were observed from week 50. No signs of arthritis or lameness were observed in any group. A significantly lower ($p < 0,001$) percentage of EAA affected eggs was observed in group V than in group H.

In this field study, MS-VAC proved to be highly effective in preventing EAA, unlike the live vaccine used as control.

INTRODUZIONE

Mycoplasma synoviae (*M.s.*) è un patogeno diffuso in Europa e nel mondo. È responsabile nel pollo soprattutto di forme articolari, come sinoviti e artriti. Altri sintomi possono coinvolgere l'apparato respiratorio, soprattutto se sono presenti infezioni concomitanti da virus della bronchite infettiva (7). Negli ultimi anni si è resa evidente nelle ovaiole la sua responsabilità primaria in merito ad alterazioni qualitative della produzione (5)(6)(3). In Gran Bretagna è segnalata una correlazione fra EAA ed infezione da *M.s.* (8). Le alterazioni possono coinvolgere fino ad un 25% della produzione (5). Le uova colpite presentano un assottigliamento del guscio, soprattutto nella porzione apicale, con forte predisposizione alla rottura. L'alterazione provoca declassamento del prodotto e conseguente perdita economica (1). La manifestazione clinica prevalente viene segnalata per questa forma anche a partire dalla seconda metà del periodo di deposizione degli animali infetti (4). È stata inoltre evidenziata una diminuzione della grammatura delle uova prodotte da ovaiole commerciali positive per *M.s.* (2). Per questi motivi si è inteso valutare, specificamente per questa forma clinica, l'efficacia in campo del vaccino MS-VAC, inattivato in emulsione oleosa, a confronto con un vaccino vivo congelato, entrambi autorizzati per la profilassi nei confronti di *M.s.*

MATERIALI E METODI

Allevamento del periodo pollastra

50.000 pulcini di gallina ovaioia commerciale, ibrido Hy-line brown, sono stati accasati ad un giorno di vita in allevamento a gabbie modificate disposte in batterie, su 4 piani separati da un sistema di raccolta ed allontanamento delle deiezioni. Mangime ed acqua sono stati forniti automaticamente per l'intera durata del ciclo di svezzamento. L'allevamento presentava un sistema di ventilazione forzata trasversale. Sono stati identificati 3 gruppi di animali allevati nelle stesse condizioni, ma mantenuti distinti per l'intera fase pollastra. Tutti i gruppi hanno ricevuto un programma vaccinale identico, ad eccezione che per *M.s.*

Il gruppo V (15.500 animali) è stato vaccinato con MS-VAC (FATRO S.p.A.), alla dose di 0,5 ml/capo. Il vaccino è stato inoculato a 7 e 13 settimane, secondo le modalità indicate da foglietto illustrativo.

Il gruppo H (15.500 animali) è stato vaccinato a 13 settimane con vaccino vivo in commercio, secondo posologia e modalità indicate da foglietto illustrativo.

Il gruppo S (19.000 animali) non è stato vaccinato nei confronti di *M.s.*, per poter prelevare da esso i soggetti sentinella da trasferire nell'allevamento di destinazione per la produzione.

Allevamento del periodo di deposizione

All'età di 15 settimane, le pollastre vaccinate sono state trasferite in allevamento di deposizione (per ovaiole commerciali), multietà e con anamnesi positiva per problemi di alterazione apicale del guscio da *M.s.*, segnalati a partire circa dalle 50 settimane di età. I gruppi sono stati mantenuti distinti fino a fine ciclo (gruppo V di 15.250 animali, gruppo H di 15.250 animali). 500 animali dei 19.000 del gruppo S sono stati anch'essi trasferiti nello stesso allevamento per fungere da sentinelle.

Gli animali sono stati allevati nelle stesse condizioni, in batterie di gabbie modificate disposte su 5 piani e con ventilazione forzata a flusso longitudinale. Mangime ed acqua sono stati forniti tramite un sistema automatizzato.

Esami sierologici

Sono stati effettuati dei prelievi di sangue a campione, a 7, 13, 23, 30, 37, 44 e 50 settimane di vita, identificati e distinti per gruppo di appartenenza degli animali. Il siero ottenuto da ciascun campione prelevato è stato congelato (-20°C) fino all'esecuzione dell'analisi. Il titolo anticorpale nei confronti di *M.s.* è stato ottenuto con metodo ELISA, kit 190313 MS IDEXX elisa.

Osservazioni cliniche

Durante la fase produttiva sono state effettuate osservazioni cliniche sugli animali, per rilevare la presenza di eventuali sintomi riferibili ad infezione da *M.s.*

Alle età di 50, 55, 56, 57, 58 e 59 settimane sono state svolte valutazioni visive a campione sulle uova dei diversi gruppi, per evidenziare e quantificare l'eventuale presenza di EAA (Egg Apex Abnormalities), che fosse tale da comportare un declassamento del prodotto. Data la struttura dell'allevamento, è stata possibile solo un'ispezione a campione delle uova, effettuata direttamente gabbia per gabbia. Per gli stessi motivi, non si è potuto procedere alla rilevazione del peso delle uova deposte nei vari gruppi.

Analisi statistica

Il numero di uova colpite è stato confrontato fra i gruppi vaccinati, mediante il test del Chi-Quadro.

Considerata l'esiguità del numero di animali da cui era composto, il gruppo S non è

rientrato nell'analisi statistica delle uova colpite da EAA, ma solo nell'indagine sierologica per monitorare l'insorgenza dell'infezione di campo e della sintomatologia clinica.

Valutazione dell'incidenza di EAA sulla qualità della produzione

Sono stati valutati gli effetti di EAA sulla qualità della produzione ed estrapolata l'incidenza degli scarti specifici sulla produzione media attesa per l'ibrido di riferimento (galline ovaiole commerciali Hy-line brown, allevate in gabbia).

RISULTATI

La **Tabella 1** riporta per ciascun prelievo la percentuale dei sieri positivi per *M.s.* ed il loro titolo anticorpale medio.

Tabella 1 Positività e titolo anticorpale sierico per *M. s.*

Età (sett.)	Gruppo V		Gruppo H		Gruppo S	
	% positivi ¹	T. m. ²	% positivi ¹	T. m. ²	% positivi ¹	T. m. ²
7	0%	/	0%	/	0%	/
13	0%	/	0%	/	0%	/
23	56,67%	2533	6,25%	1229	10%	3140
30	83,33%	5870	43,75%	2484	60%	1816
37	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	100%	1907
44	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	90%	2024
50	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	90%	1852

¹Percentuale dei titoli positivi, sul totale dei campioni; ²Titolo medio dei positivi, n.e. = analisi non eseguita

La positivizzazione sierologica del gruppo sentinella ha indicato l'avvenuta circolazione di *M.s.* in allevamento. È stata quindi ritenuta superflua l'analisi sierologica dei campioni dai gruppi vaccinati prelevati successivamente alla 30^a settimana.

Durante l'intero ciclo di produzione non sono stati evidenziati sintomi clinici di natura articolare, riferibili ad una infezione da *M.s.* Viceversa sono state osservate anomalie dell'apice del guscio (EAA) da *M. s.* I dati raccolti durante l'osservazione clinica sono riportati in **Tabella 2**.

Tabella 2 Uova colpite da EAA, all'osservazione clinica

Età (sett.)	Gruppo V			Gruppo H			Gruppo S		
	Campione (n°)	EAA (n°)	EAA (%)	Campione (n°)	EAA (n°)	EAA (%)	Campione (n°)	EAA (n°)	EAA (%)
50	251	2	0,80%	250	4	1,60%	29	0	0%
55	345	5	1,45%	319	13	4,08%	69	3	4,35%
56	1096	15	1,37%	1097	24	2,19%	85	3	3,53%
57	1116	16	1,43%	1036	28	2,70%	80	2	2,50%
58	590	4	0,68%	547	10	1,83%	39	1	2,56%
59	1189	10	0,84%	1125	16	1,42%	79	1	1,27%

Nel gruppo V è stata osservata costantemente una percentuale di uova con alterazioni riconducibili ad EAA inferiore rispetto al gruppo H: All'analisi statistica, questa differenza risulta altamente significativa (p=0,000 con significatività per p<0,001).

Si riporta nella **Tabella 3** l'incidenza dello scarto per EAA da *M.s.*, sulla produzione media dell'ibrido di riferimento.

Tabella 3 Incidenza di EAA sulla produzione media

Età (sett.)	Ibrido di riferimento	Gruppo V	Gruppo H
	³ Uova/gallina presente	N° uova perse per EAA /gallina presente	N° uova perse per EAA /gallina presente
50	6,2	0,05	0,10
55	6,05	0,09	0,25
56	6,05	0,08	0,13
57	6,05	0,09	0,16
58	6	0,04	0,11
59	6,05	0,05	0,09
TOT.	36,4	0,40	0,84

³Media delle uova prodotte per gallina presente, da tabella degli obiettivi di performance dell'ibrido di riferimento.

Nella **Tabella 4** si riporta una stima delle uova perse nei gruppi vaccinati, rispetto alla produzione media di riferimento.

Tabella 4 Perdita di uova sulla produzione media

Età (sett.)	Ibrido di riferimento	Gruppo V	Gruppo H
	Uova prodotte (15.250 galline)	N° uova perse per EAA (15.250 galline)	N° uova perse per EAA (15.250 galline)
⁴ TOT.	555.100	6.100	12.810

⁴Settimane 50, 55, 56, 57, 58, 59

DISCUSSIONE

Dalla **Tabella 1** risulta come gli animali sentinella, non vaccinati per *M.s.*, si siano positivizzati durante la deposizione, a partire dalla settimana 23. Durante la seconda metà del periodo di deposizione sono state riscontrate in tutti i gruppi alterazioni dell'uovo riconducibili a *M.s.*, come riferito per i cicli precedenti.

Durante le sei settimane in cui sono state svolte le valutazioni sulla produzione (**Tabella 2**), la percentuale di uova con EAA è risultata significativamente più elevata nel gruppo H, vaccinato con vaccino vivo, rispetto al gruppo V, vaccinato con vaccino inattivato in emulsione oleosa.

Come si evince da **Tabella 4**, l'estrapolazione dei dati osservati alla produzione media attesa indica come il gruppo V possa aver avuto perdite di uova conseguenti ad anomalie dell'apice del guscio sensibilmente inferiori (circa il 50% in meno di uova perse) rispetto a quelle del gruppo H. Ovviamente, considerato che l'osservazione clinica è stata concentrata nelle 6 settimane di maggior incidenza della patologia e sul rilievo delle sole EAA, la differenza di perdita economica nei due gruppi è sicuramente sottostimata.

CONCLUSIONI

Nel caso analizzato, a seguito dell'infezione da *M.s.* dei gruppi oggetto della prova, la vaccinazione con MS-VAC, vaccino inattivato in emulsione oleosa, ha comportato un miglioramento altamente significativo delle performance produttive degli animali, in termini di qualità del guscio e di lesioni specifiche localizzate sull'apice dell'uovo, rispetto al vaccino vivo.

Si può quindi concludere che in caso di problematiche da *M. synoviae* in ovaiole in deposizione in allevamento, il ricorso alla vaccinazione con MS-VAC permette di controllare anche i danni provocati dalla forma clinica Eggshell Apex Abnormalities.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. Fabio Ostanello, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, per l'elaborazione statistica dei dati.

Si ringrazia il Dott. Alberto Treccani, per il supporto fornito nell'individuazione degli allevamenti idonei ai fini della prova.

Si ringrazia infine il Dott. Elia Marigo, per il gentile e sostanziale contributo nella raccolta dei campioni e dei dati.

BIBLIOGRAFIA

1. Brandão M. D. M., Santos F. F., Machado L. S., Verinaud M. S., Oliveira J. M., Soares N. M., Nascimento E. R. and Pereira V. L. A. (2014). The effect of eggshell abnormalities on table egg quality during storage in 2 seasons of the year. *Poultry Science*. 93, 2657-2662.
2. Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Terregino C., Iob L. and Robin A. J. N. (2010). Treatment of Eggshell Abnormalities and Reduced Egg Production Caused by *Mycoplasma synoviae* Infection. *Avian Diseases*. 54, 961-964.
3. Catania S., Gobbo F., Bilato D., Gagliazzo L., Moronato M. L., Terregino C., Bradbury J. M. and Ramírez A. S. (2016). Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Veterinary Microbiology*. 193, 60-66.
4. Eun-Ok Jeon, Jong-Nyeo Kim, Hae-Rim Lee, Bon-Sang Koo, Kyeong-Cheol Min, Moo-Sung Han, Seung-Baek Lee, Yeon-Ji Bae, Jong-Suk Mo, Sun-Hyung Cho, Chang-Hee Lee and In-Pil Mo. (2014). Eggshell apex abnormalities associated with *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Journal of Veterinary Science*. 15(4), 579-582
5. Feberwee A., de Wit J. J. and Landman W. J. M. (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology*. (38)1, 77-85.
6. Gole V. C., Chousalkar K. K. and Roberts J. R. (2012). Prevalence of antibodies to *Mycoplasma synoviae* in laying hens and possible effects on egg shell quality. *Preventive Veterinary Medicine*. 106, 75-78.
7. Landman W. J. M. and Feberwee A. (2004). Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathology*. 33(6), 591-598.
8. Strugnell B. W., McMullin P., Wood A. M., Nicholas R. A. J., Ayling R. and Irvine R. M. (2011). Unusual eggshell defects in a free-range layer flock in Great Britain. *Veterinary Record*. 169, 237-238.



INDICE DEGLI AUTORI

A

Aceto S. 105
Alberti S. 89
Alessandri G. 109
Antoci F. 215
Azzolini A. 91

B

Barbieri I. 221
Bassi E. 247
Battistoni F. 21
Bekó K. 149
Bellucci S. 173
Benedetti V. 145
Beoni M. 99
Berto G. 159
Boldini S. 99
Bonfante F. 133
Borchert-Stuhlträger M. 113
Borda-Molina D. 65
Borrelli L. 105
Bottinelli M. 43, 49, 51, 109
Bovera F. 105
Branciaro R. 173
Brigidi P. 59
Brunetta R. 35
Burzoni G. 247

C

Camarda A. 53, 113, 203
Camarinha-Silva A. 65
Canevaro A. 133
Canziani S. 221

Careno S. 247
Casagrande Proietti P. 173
Cascone G. 215
Castellone F. 81
Catania S. 43, 49, 51, 109, 149
Catelli E. 113, 145, 159
Cecchinato M. 81, 119, 139, 229
Ceoletta A. 109
Ceroni S. 159
Ceruti R. 229
Chiari M. 221
Circella E. 53, 113, 203
Cocciolo G. 113
Cookson K. 89
Coretti L. 105
Cunial G. 91

D

Dalla Costa A. 91
Dal Prà M. 149
De Cesare A. 73
Demey V. 167
Di Francesco C.E. 209
Di Giannatale E. 209
Di Martino G. 91
D'Incau M. 39
Dipineto L. 105
Drigo M. 119, 139

F

Facchetti G. 31
Felici M. 237
Fincato A. 109

Fiorentini L. 25, 99, 183, 237
Fioretti A. 105
Fornasiero D. 91
Franciosini M.P. 173
Franzo G. 81, 119, 139, 229
Fregnani G. 99

G

Gaffuri A. 39
Gavazzi L. 229
Ghiselli F. 237
Giannone A. 173
Gibelli L. 39
Giovagnoni G. 127
Gobbo F. 91, 133
Grilli E. 127, 237
Grilli G. 221
Gyuranecz M. 149

J

Jankowski J. 167

K

Koutoulis K. 81

L

Lanza M. 215
Lavazza A. 39, 221
Legnardi M. 119, 139, 229
Lelli D. 221
Ligabue M. 167
Loria G.R. 215
Lupini C. 113, 145, 159

M

Magrini M. 99, 203
Manfreda G. 73
Mantovani C. 51
Marcolin R. 51
Marsilio F. 209
Martini M. 119
Massi P. 25, 183, 229, 237
Matucci A. 149
Menchetti L. 173
Menna L. F. 105
Mescolini G. 113, 145, 159
Messina A. 55, 215
Mikulska M. 167
Mikulski D. 167
Moreno A. 39, 221, 229
Moronato M.L.
Muccioli F. 159
Muhammad F. 209
Mulatti P. 91
Musa L. 173

O

Ortali G. 229

P

Pace A. 105
Paladino A. 43, 49, 51, 109, 149
Parigi M. 25, 99, 183, 237
Parisio G. 221
Pesente P. 229
Petri D. 83
Picchi M. 43, 109

Piva A. 127, 237

Prentza Z. 81

Profeta F. 209

Pugliese N. 113, 203

Puleio R. 215

Q

Quaglia G. 145, 159

Quaranta E. 149

R

Rodehutscord M. 65

Roila R. 173

Rosignoli C. 39

Russo E. 99

Russo T. P. 105

S

Sallemi S. 215

Salogni C. 39

Salviato A. 91

Sangiorgi A. 203

Sangiovanni M. 237

Santaniello A. 105

Schiavone A. 203

Scolamacchia F. 91, 133

Smoglica C. 209

Sozzi E. 221

Stamilla A. 55, 215

Stefani E. 149

T

Terregino C. 91, 133

Thomas E. 113

Tondo A. 149

Toscani T. 209

Tosi G. 25, 99, 183, 229, 237

Tovani A. 159

Trevisani G. 99

Trogu T. 39, 221, 229

Tucciarone C. M. 139

Tucciarone C.M. 119, 229

Tugnoli B. 127, 237

Turri V. 183

V

Valoroso M. C. 105

Varriale L. 105

Vesentini G. 43

Volorio A. 145

W

Weber R. 89

Z

Zanardello C. 45, 133

Zecchin B. 133

Zoller H. 113

IL SUO INTESTINO STA BRUCIANDO INSIEME AL TUO PROFITTO

Hemicell HT

I β -mannani presenti nelle farine vegetali possono stimolare un'inutile reazione infiammatoria intestinale¹, innescata dal sistema immunitario innato². Chiedi informazioni sui benefici di Hemicell HT al tuo rappresentante Elanco.

**Controlla la reazione infiammatoria³.
Aggiungi Hemicell HT alla razione alimentare.**



¹ Ikegami, S., Tsuchihashi, F., Harada, H. et al. 1990. "Effect of Viscous Indigestible Polysaccharides on Pancreatic-Biliary Secretion and Digestive Organs in Rats." *Journ. of Nutrition*, 120: 353-360.

² Geniec, N.O., Alei, F., and Klasing, K. 2015. "Effect of Hemicell HT Enzyme on the Immune System of Chickens and their Performance." *International Poultry Scientific Forum*.

³ Elanco Animal Health. Data on file.

© Elanco 2019 – PM-HT-19-0062 - Hemicell HT, Elanco e la banda diagonale sono marchi registrati da Elanco o sue affiliate.



Elanco Italia S.p.A.
Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto Fiorentino (FI)
tel.: +39 055 4257031 - e-mail: team_elanco@elanco.com

Elanco

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 - info@fatro.it



VACCINARE IL
100%
CONTRO LA
COCCIDIOSI
E' POSSIBILE

EVANT[®]

Con **HIPRAMUNE**[®] T
Sospensione e solvente per spray orale per polli

Vaccino vivo attenuato contro la coccidiosi
nei polli in sospensione per spray orale

Powered by
SMART
VACCINATION



il Riferimento
nella **Prevenzione**
in **Salute Animale**

EVANT[®] sospensione e solvente per spray orale per polli. **COMPOSIZIONE:** ogni dose (0,007 ml) di vaccino non diluito contiene: *Eimeria acervulina* ceppo 003, 332-450^{*}; *Eimeria maxima* ceppo 013, 196-265^{*}; *Eimeria mitis* ceppo 006, 293-397^{*}; *Eimeria praecox* strain 007, 293-397^{*}; *Eimeria tenella* ceppo 004, 276-374^{*}. *Numero di oocisti sporulate. **SOLVENTE:** HIPRAMUNE[®]T. **INDICAZIONI:** per l'immunizzazione attiva dei pulcini a partire da 1 giorno di età per ridurre le lesioni intestinali e la produzione di oocisti associate a coccidiosi provocata da *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* ed *Eimeria tenella* e per ridurre segni clinici (diarrea) associati a *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella*. Inizio dell'immunità: 14 giorni dopo la vaccinazione. **POSOLOGIA E VIA DI SOMMINISTRAZIONE:** per uso orale. Il metodo di somministrazione è mediante spray a gocce grosse servendosi di un dispositivo adatto. Prima di iniziare la preparazione, verificare di avere a disposizione un contenitore pulito con capacità sufficiente alla preparazione della sospensione di vaccino diluita: capacità da 280 ml, 1.400 ml o 2.800 ml rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi. Aggiungere dell'acqua a temperatura ambiente (223 ml, 1.115 ml o 2.230 ml di acqua rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi). Agitare il flacone del solvente. Diluire il contenuto del flacone con acqua pulita a temperatura ambiente in un contenitore adeguato. Agitare il flacone del vaccino e diluire il contenuto nella soluzione preparata. Dopo la diluizione si ottiene una sospensione violacea. Riempire il serbatoio del dispositivo nebulizzatore con la sospensione di vaccino preparata. Durante la somministrazione ai pulcini mediante spray a gocce grosse, mantenere la sospensione di vaccino diluito costantemente omogeneizzata, usando un agitatore magnetico. Per migliorare l'uniformità della vaccinazione, è consigliabile tenere i pulcini all'interno del box di trasporto per almeno 1 ora, in modo che possano assimilare tutte le gocce di vaccino. Dopo questo periodo di tempo, posare i pulcini delicatamente sulla lettiera e proseguire con le regolari pratiche di gestione. **POSOLOGIA:** una dose di vaccino (0,007 ml) a partire da 1 giorno di età. **REAZIONI AVVERSE:** nessuna. **TEMPO DI ATTESA:** 0 giorni. **PRECAUZIONI SPECIALI:** i polli nelle prime 3 settimane dopo la vaccinazione devono essere assolutamente allevati a terra. Si raccomanda di eliminare la lettiera e di pulire le strutture e i materiali fra i cicli di produzione per ridurre le infezioni di campo. Non deve essere utilizzata nessuna sostanza anticoccidica o altri agenti con attività anticoccidica attraverso l'alimentazione o l'acqua per almeno 3 settimane dopo la vaccinazione dei polli con questo prodotto, in caso contrario la replicazione corretta delle oocisti del vaccino, e di conseguenza lo sviluppo di un'immunità solida potrebbero essere compromesse. Inoltre, la durata dell'immunità dipende dall'ambiente che permette il riciclo delle oocisti, quindi deve essere tenuto presente che una decisione di utilizzare sostanze anticoccidiche nel periodo di 3 settimane dopo la vaccinazione debba essere presa tenendo in considerazione il potenziale impatto negativo sulla durata dell'immunità di questo prodotto. Conservare e trasportare il vaccino in frigorifero (2 °C-8 °C). Non congelare. Periodo di validità del medicinale veterinario confezionato per la vendita: 10 mesi. Periodo di validità dopo diluizione conformemente alle istruzioni: 10 ore. **CONFEZIONI:** scatola di cartone con un flaconcino di EVANT[®] contenente 7 ml (1.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE[®]T contenente 50 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT[®] contenente 35 ml (5.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE[®]T contenente 250 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT[®] contenente 70 ml (10.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE[®]T contenente 500 ml. **NUMERO DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** EU/2/18/233/001-003. **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 E. Mattei n. 2, 25030 Coccaglio (Brescia), ITALIA. Tel. (+39) 030 7241821, Fax (+39) 030 7700881. **CONDIZIONI PER LA DISTRIBUZIONE:** medicinale veterinario soggetto a prescrizione. **SOLO PER USO VETERINARIO. USARE I MEDICINALI RESPONSABILMENTE.**



B-Act[®]

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

HUVEPHARMA NV | UITBREIDINGSTRAAT 80 | 2600 ANTWERP | BELGIUM | TEL +32 3 288 1849 | FAX +32 3 289 7845 | CUSTOMERSERVICE@HUVEPHARMA.COM
HUVEPHARMA EOOD | 5TH FLOOR | 3A NIKOLAY HAITOV STR. | 1113 SOFIA | BULGARIA | TEL +359 2 862 5331 | FAX +359 2 862 5334 | SALES@HUVEPHARMA.COM



Exzolt®

FLURALANER

Exzolt rappresenta l'approccio innovativo e rivoluzionario per la gestione completa delle infestazioni da pidocchio rosso nell'allevamento avicolo, esplicitando un'attività acaricida sistemica che permette di evitare il contatto dell'animale con pesticidi o altre sostanze chimiche.

Exzolt offre una combinazione di vantaggi tali da farne un prodotto unico per migliorare il benessere e la produttività di pollastre, riproduttori e galline ovaiole minacciate dal pidocchio rosso.



LA RIVOLUZIONE NEL CONTROLLO DEL PIDOCCHIO ROSSO!

Materiale riservato ai sigg. Medici Veterinari e Farmacisti.
Per maggiori informazioni sul prodotto, consultare il foglietto illustrativo/RCP.

 **MSD**
Animal Health



Perché sappiamo
cosa conta veramente per te



Innovazione - Protezione - Risultati

Chiedi informazioni al tuo veterinario sulla nostra linea di vaccini avicoli

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

zoetis

Finito di stampare
nel mese di Ottobre 2019
da La Ducale Srl - Parma