



# **SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

## **Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 2020**



## **LIX CONVEGNO ANNUALE V SIMPOSIO SCIENTIFICO**

**Verona (VR), 30 Gennaio 2020  
Online, 12 e 19 Novembre 2020**



**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2020**

**Verona (VR), 30 Gennaio 2020  
Online, 12 e 19 Novembre 2020**



## INDICE

*Prefazione* ..... pag. 17

### LIX CONVEGNO NAZIONALE

*Verona (VR), 30 Gennaio 2020*

#### INCONTRO

*L'Avicoltura: una zootecnia virtuosa?*

*Sostenibilità della filiera avicola*

- ENVIRONMENTAL IMPACT OF POULTRY PRODUCTION  
*Bacenetti J., Costantini M.* ..... pag. 21
- VALORIZZAZIONE ENERGETICA DEGLI EFFLUENTI AVICOLI  
*Piccinini S., Garuti M.* ..... pag. 29
- SUSTAINABILITY AND THE POULTRY INDUSTRY  
*Burnside T.* ..... pag. 35
- TRENDS IN POULTRY SUSTAINABILITY AND WELFARE  
*Opengart K.* ..... pag. 37

### ATTI DEL V SIMPOSIO SCIENTIFICO

*Online, 12 e 19 Novembre 2020*

#### COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- CARATTERIZZAZIONI GENOTIPICHE E FENOTIPICHE DI CEPPI DI *RIE-MERELLA ANATIPESTIFER* ISOLATI DAL POLLAME IN ITALIA  
*Bano L., Cornaggia M., Di Castri A., Zandonà L., Rizzardi A., Zarpellon G., Guolo A., Ferro T., Moschioni C., Tonon E., Bacchin C., Ceruti R., Giovanardi D., Catania S., Drigo I.* ..... pag. 45

- INCIDENZA DELLA MORTALITA' EMBRIONALE IN UOVA DA COVA SOTTOPOSTE A VACCINAZIONE "IN OVO"  
*Bongiorno V., Castellina C., Ferrazzi V., Grilli G. .... pag. 53*
- INDAGINE SU STAPHYLOCOCCI METICILLINO-RESISTENTI ED ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI ESBL IN UN ALLEVAMENTO INTENSIVO DI BROILER DEL NORD-OVEST ITALIA  
*Bonvegna M., Dellepiane L., Stella M.C., Tomassone L., Nebbia P., Piovano F., Mannelli A. .... pag. 61*
- STUDIO DELLA REPLICAZIONE E TRASMISSIONE IN POLLO, TACCHINO E FARAONA DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA H5N8 AD ALTA PATOGENICITA' RESPONSABILE DELL'EPIDEMIA EUROPEA 2019/20 E CONFRONTO CON IL VIRUS H5N8 DEL 2016/17  
*Bortolami A., Mazzetto E., Verin R., Zanardello C., Panzarin V., Scolamacchia F., Terregino C., Bonfante F. .... pag. 67*
- VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI VACCINI INNOVATIVI PRODOTTI IN PIANTA E SVILUPPO DI UNA STRATEGIA DIVA PER LA MALATTIA DI GUMBORO  
*Bortolami A., Marusic C., Drissi Touzani C., Donini M., Lico C., Rage E., Bonfante F., Zanardello C., Mazzacan E., El Houadfi M., Terregino C., Baschieri S. .... pag. 79*
- VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI BIOFILM DA PARTE DI DIVERSE SPECIE DI MICOPLASMI ISOLABILI IN SPECIE AVICOLE INDUSTRIALI  
*Bottinelli M., Picchi M., Tondo A., De Grandi G., Fincato A., Rossi I., Merenda M., Catania S. .... pag. 83*
- INDAGINI DIAGNOSTICHE IN EPISODI DI CORIZZA DEL FAGIANO RIPRODUTTORE  
*Di Castri A., Cornaggia M., Viel L., Losasso C., Orsini M., Peruzzo A., Catania S., Zanardello C., Gobbo F., Bano L. .... pag. 87*
- ATTIVITÀ ANTICOCCIDICA IN VITRO DI ESTRATTI VEGETALI  
*Felici M., Tugnoli B., Ghiselli F., Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Piva A., Grilli E. .... pag. 97*
- RICOSTRUZIONE TRAMITE UN APPROCCIO FILODINAMICO DELLA CIRCOLAZIONE DI AVIAN METAPNEUMOVIRUS SOTTOTIPO B IN EUROPA  
*Franzo G., Legnardi M., Mescolini G., Tucciarone C.M., Lupini C., Quaglia G., Catelli E., Cecchinato M. .... pag. 109*

- STUDIO DELLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA NEGLI ALLEVAMENTI DI POLLASTRE DELLA LINEA OVAIOLE DA CONSUMO NEL PERIODO MAGGIO - SETTEMBRE 2019  
*Gambi L., Berto G., Fiorentini L., Koutoulis K., Barbieri I., Massi P., Tosi G. .... pag. 119*
- ANALISI GENOMICA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLATI DA ORGANI PARENCHIMATOSI DI POLLI DA CARNE E GALLINE OVAIOLE CON LESIONI RICONDUCEBILI AD *AVIAN VIBRIONIC HEPATITIS/SPOTTY LIVER DISEASE*  
*Laconi A., Drigo I., Palmieri N., Carraro L., Tonon E., Franch R., Bano L., Piccirillo A. .... pag. 127*
- VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DELLA FERTILIZZAZIONE CON POLLINA DI ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE SULLE COMUNITÀ MICROBICHE E SU GENI DI RESISTENZA DI TERRENI AGRICOLI  
*Laconi A., Tolosi R., Grilli G., Trocino A., Carraro L., Di Cesare F., Cagnardi P., Piccirillo A. .... pag. 137*
- EVIDENZE SIEROLOGICHE DI CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO C IN GERMANI REALI IN NORD ITALIA  
*Legnardi M., Allée C., Franzo G., Cecchinato M., Brown P.A. .... pag. 151*
- SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA DI CEPPI *ESCHERICHIA COLI* E DIFFUSIONE DI *E. COLI* ESBL IN POLLI DA CARNE BIOLOGICI, ANTIBIOTIC FREE E CONVENZIONALI ALLA MACELLAZIONE  
*Musa L., Franciosini M.P., Branciani R., Menchetti M., Marenzoni M.L., Ranucci D., Shylla Kika T., Casagrande-Proietti P. .... pag. 157*
- STUDIO DEI FATTORI DI VIRULENZA E PROFILO DI ANTIMICROBICO-RESISTENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE DA CONSUMO  
*Rossini R., Gambi L., Menandro M.L., Franzo G., Paola M., Tosi G., D'Incau M., Fiorentini L. .... pag. 169*
- BATTERI ENTEROPATOGENI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEL GABBIANO REALE (*Larus michahellis*)  
*Russo T.P., Dipineto L., Borrelli L., Varriale L., Pace A., Minichino A., Pompameo M., Menna L.F., Santaniello A., Fioretti A. .... pag. 183*
- CONFRONTO TRA PIANI VACCINALI TRADIZIONALI E RHVT PER MALATTIA DI GUMBORO NEL BROILER: SIEROLOGIA E PERFORMANCE IN CAMPO  
*Russo E., Boldini S. .... pag. 189*

- TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI ISOLATI ITALIANI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*: RISULTATI PRELIMINARI  
*Stefani E., Matucci A., Tondo A., De Grandi G., Dal Pra M., Gastaldelli M., Catania S.*..... **pag. 193**
  
- DIAGNOSI MOLECOLARE DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE: COME LA SCELTA DEL PROTOCOLLO E LA CONCENTRAZIONE VIRALE POSSONO INFLUENZARE L'IDENTIFICAZIONE E LA CARATTERIZZAZIONE DEL VIRUS IN PRESENZA DI COINFEZIONI  
*Tucciarone C.M., Legnardi M., Franzo G., Fortin A., Valastro V., Terregino C., Cecchinato M.*..... **pag. 205**
  
- **INDICE DEGLI AUTORI**..... **pag. 213**





## PER RISOLVERE I PROBLEMI PIÙ COMUNI IN AVICOLTURA

la nostra gamma di prodotti liquidi naturali

### Citrospir

E' utile come supporto nel corso di trattamenti veterinari contro il dolore ed i mali stagionali.



### CitroClò

Agisce a livello intestinale limitando gli effetti delle più diffuse problematiche digestive.



### Ecotrofin® L-CX

Con oli di Meliaceae, aglio e timo. Riduce naturalmente le problematiche parassitarie intestinali.



# ROSS 308 DELIVERS

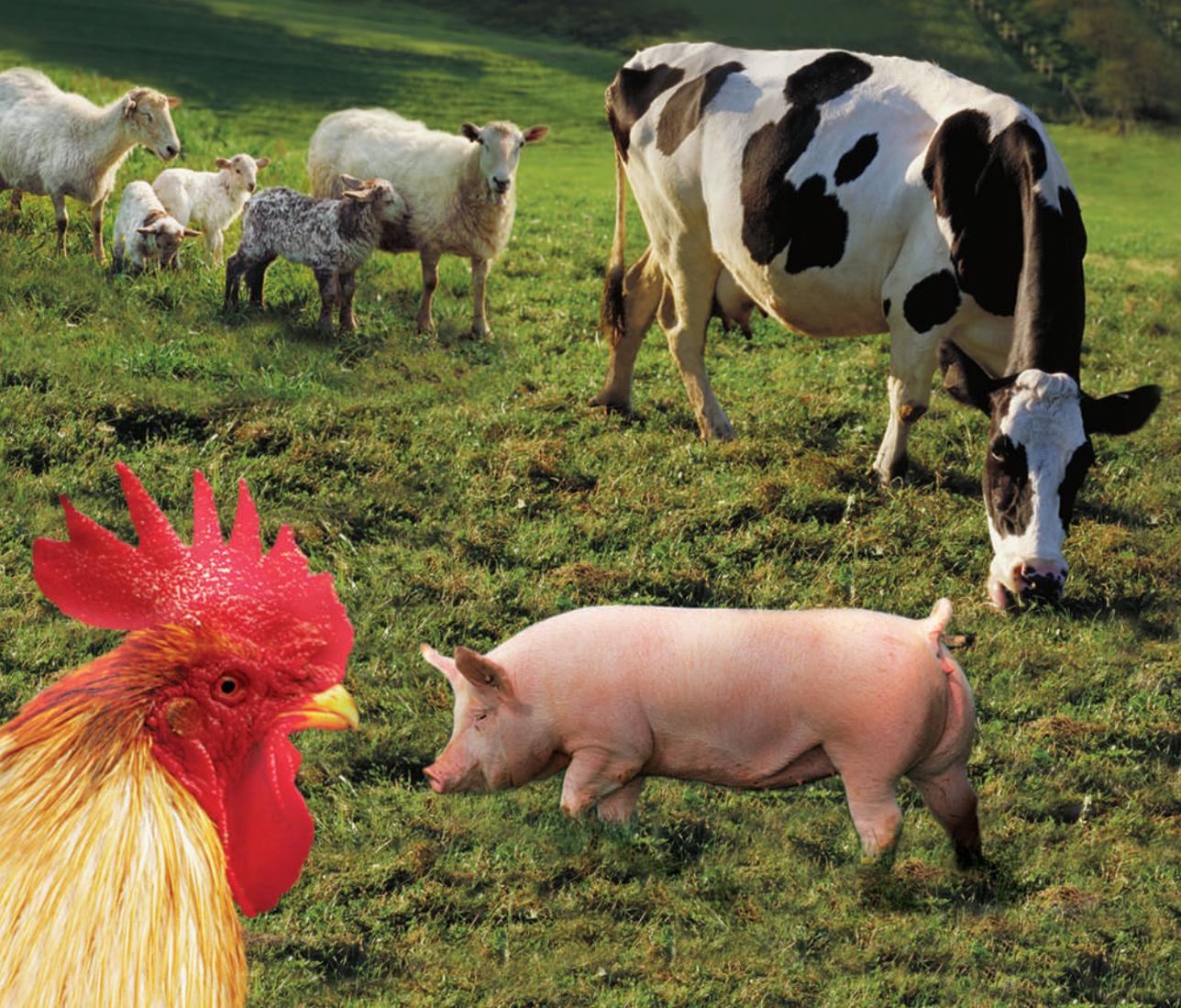
- Excellent FCR
- Outstanding Chick Output
- First-Class Welfare Traits

Visit [www.aviagen.com/Ross](http://www.aviagen.com/Ross)  
to learn how Ross® 308  
will deliver for you.



Aviagen®





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



[www.vetclub.it](http://www.vetclub.it) 



# Gallivac IB88 NeO<sub>2</sub> Avinew NeO<sub>2</sub>

## LE COMPRESSE EFFERVESCENTI CHE SEMPLIFICANO LA VACCINAZIONE

**GALLIVAC IB88 NeO** e **AVINEW NeO** sono ora disponibili nella nuova formulazione effervescente. Basta mettere la compressa 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**\*



### DISPONIBILI IN 2 CONFEZIONI:

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

\* Il nuovo confezionamento riduce il peso dei rifiuti prodotti di 10 volte rispetto ai tradizionali flaconi di vetro. La scatola di cartone è certificata FSC (Responsible Forest Management), inducendo un minore impatto sull'ambiente ("carbon foot print"). Il sito di produzione utilizza tecnologie su licenza di "Phibro Animal Health Corporation USA" e suoi affiliati. Gallivac IB88 e Avinew, sono marchi registrati Boehringer Ingelheim Animal Health



*Together, beyond animal health*



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

Il nostro impegno  
per l'industria avicola

ASSOCIAZIONE VINCENTE

GLUTARALDEIDE

BENZALCONIO



**Glutarsan®**



EFFICACIA  
CERTIFICATA

BATTERI

MUFFE  
e LIEVITI

VIRUS

DISINFEZIONE INTEGRALE



**chemifarma®** S.p.A.  
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

# L'Uniformità è Importante



Una uniformità prevedibile è un valore aggiunto per i vostri affari

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



COBB-VANTRESS.COM



UNA FAMIGLIA.  
UN PROPOSITO.

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2020 sono realizzate grazie al contributo di:

• ASCOR Business Unit di Vetoquinol Italia •

• AVIAGEN Italia •

• BAYER Sanità animale •

• BOEHRINGER INGELHEIM •

• CEVA Salute animale •

• CHEMIFARMA •

• COBB •

• ELANCO Animal Health •

• FATRO •

• HIPRA •

• HUVEPHARMA •

• LALLEMAND Animal Nutrition •

• MSD Animal Health •

• ZOETIS Italia •



## PREFAZIONE

Legnaro (PD), 28 agosto 2020

Come consuetudine, pubblichiamo gli Atti del LIX Convegno nazionale e del V Simposio Scientifico. L'aver anticipato il nostro convegno nazionale, tenutosi a Verona in concomitanza con Fieragricola, al 30 gennaio ci ha permesso di incontrarci e svolgere in maniera consueta l'attività congressuale prima delle restrizioni legate al COVID-19. La sostenibilità della filiera avicola, tema che sarà centrale per la zootecnia anche nei prossimi anni, è stata trattata da relatori esperti dell'argomento sia nazionali che internazionali che desidero ringraziare per l'elevato valore scientifico degli interventi. Al contrario la situazione epidemiologica non ci ha permesso di organizzare il V Simposio in presenza ma di svilupparlo in due giornate in via telematica (12 e 19 novembre 2020). Sicuramente tale modalità permette una maggiore visione dei vari lavori presentati data anche la possibilità di fruire delle relazioni registrate dopo gli eventi ma spero già a partire dal prossimo convegno di tornare alla consuetudine per poter dare maggiore visibilità e spazio ai nostri sponsor e anche per poter avere l'opportunità di incontrarsi di persona, cosa che facilita scambi di opinioni e rafforza il clima di collaborazione e amicizia all'interno della nostra società scientifica. Società che sembra essere sempre più viva e con un futuro date le crescenti relazioni presentate al nostro simposio. In questa edizione sono ben 19 le relazioni presentate dai vari gruppi di ricerca.

Il 2021 sarà un anno importante per SIPA dato che organizzerà il convegno mondiale della WVPA a Verona e si tornerà a svolgere il nostro convegno annuale, in collaborazione con l'associazione scientifica di Avicoltura, all'interno della rinnovata Fiera avicola che si terrà a Rimini. In vista di questi prestigiosi impegni chiedo a tutti voi soci di supportarne a vario titolo l'organizzazione e di contribuire alla pubblicizzazione degli stessi nei vostri ambiti.

Mi preme infine ricordare con affetto e riconoscenza due pilastri della patologia aviaria italiana, il Prof. Quaglio e il Prof. Zanella, che hanno contribuito in maniera significativa alla nascita e crescita della nostra società e che nel corso del 2020 ci hanno lasciato.

Un caro saluto,

*Prof. Mattia Cecchinato*  
*Presidente SIPA*



LIX CONVEGNO NAZIONALE

**INCONTRO**

**L'Avicoltura: una zootecnia virtuosa?  
Sostenibilità della filiera avicola**

Verona (VR), 30 Gennaio 2020



# ENVIRONMENTAL IMPACT OF POULTRY PRODUCTION

Bacchetti J., Costantini M.

Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali (ESP), Università degli Studi di Milano

30 Gennaio 2020  
LIX Convegno Annuale SIPA

## Environmental impact of poultry production



Jacopo Bacchetti, Michele Costantini  
Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali (ESP)  
Università degli Studi di Milano  
[jacopo.bacchetti@unimi.it](mailto:jacopo.bacchetti@unimi.it)

SOMMARIO

- 1 - L'AGRI-FOOD LCA LAB
- 2 - L'APPROCCIO DI ANALISI DEL CICLO DI VITA
- 3 - CASO STUDIO: IMPATTO AMBIENTALE DELLA PRODUZIONE DI CARNE DI POLLO  
Cesari et al., 2017. Environmental impact assessment of an Italian vertically integrated broiler system through a Life Cycle approach. *J. of Cleaner production*
- 4 - CASO STUDIO: IMPATTO AMBIENTALE DELLA PRODUZIONE DI UOVA BIOLOGICHE  
Daniela Lovarelli, Michele Costantini, Valentina Ferrante, Jacopo Bacchetti, Marcella Guarino. Under Review
- 5 - CONCLUSIONI

### L'AGRIFOOD LCA LAB



**Agrifood LCA Laboratory**  
È un Laboratorio interdisciplinare costituito, all'interno del **DISAA** (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agronomia e Pesca) dell'Università degli Studi di Milano, da un gruppo di ricercatori e professori che si occupano dell'applicazione dell'LCA (Life Cycle Assessment) nel settore agrifood. Partecipano alle attività del Laboratorio anche ricercatori e professori del Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali.



[https://sites.unimi.it/agrifood\\_lcalab/](https://sites.unimi.it/agrifood_lcalab/)

### SOSTENIBILITA' COMPLESSIVA

Aspetti Economici €  
Aspetti Energetici J  
Aspetti Ambientali kg CO<sub>2</sub>eq

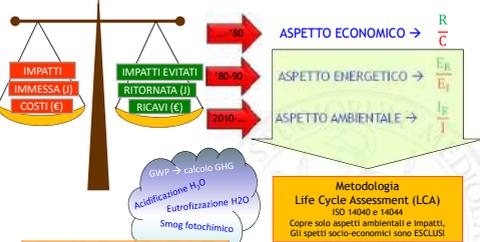
**SOSTENIBILITA' COMPLESSIVA SC**

ATTENZIONE  
L'analisi economica è la più agevole, Metodologie definite e accettate da tempo

CALCOLARE → Input / Output  
ESEGUIRE → **BILANCIO O/I**

### LA SOSTENIBILITÀ: UN CONCETTO IN EVOLUZIONE (1)

Il concetto di sostenibilità si è rapidamente evoluto nel tempo



ASPECTO ECONOMICO →  $\frac{R}{C}$   
ASPECTO ENERGETICO →  $\frac{E_k}{E_j}$   
ASPECTO AMBIENTALE →  $\frac{I_p}{I}$

IMPATTI IMMESSA (I) COSTI (C)  
IMPATTI EVITATI RITORNATA (I) RICAVI (C)

Metodologia Life Cycle Assessment (LCA) ISO 14040 e 14044  
Copre solo aspetti ambientali e impatti, Gli spetti socio-economici sono ESCLUSI

METODO ANALISI CML2 Baseline 2000 Method n.10 Categorie di impatto ambientale

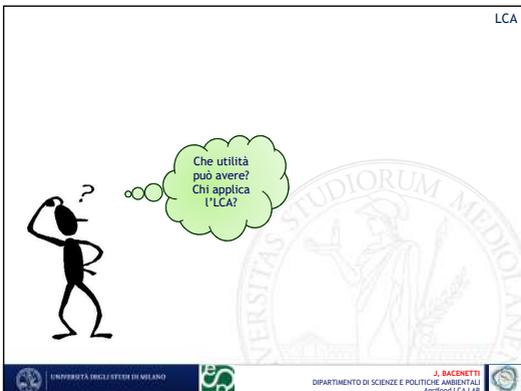
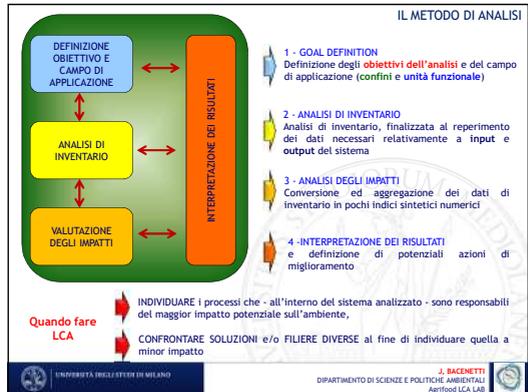
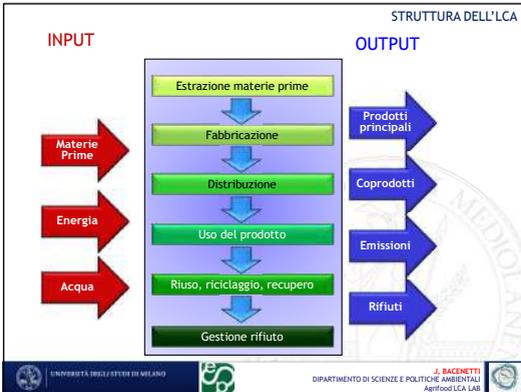
GWP → calcolo GHG  
Acidificazione H<sub>2</sub>O  
Eutrofizzazione H<sub>2</sub>O  
Smog fotochimico

### L'ANALISI DEL CICLO DI VITA

LCA (Life Cycle Assessment - Valutazione del Ciclo di Vita) è una metodologia utilizzata per valutare il potenziale impatto ambientale di un prodotto, di un processo o di un'attività durante tutto il suo ciclo di vita, tramite:

Processo di **compilazione** e **valutazione** degli ingressi e delle uscite e degli impatti ambientali **potenziali** di un sistema **prodotto** attraverso il suo **ciclo di vita**

Ciclo di Vita → Quest'approccio è ormai considerato centrale per il tema della sostenibilità: L'uso dell'LCA è in alcuni casi obbligatorio, in altri raccomandato ed è in ogni caso un elemento di qualificazione in tutti i campi dove è richiesta una valutazione della sostenibilità

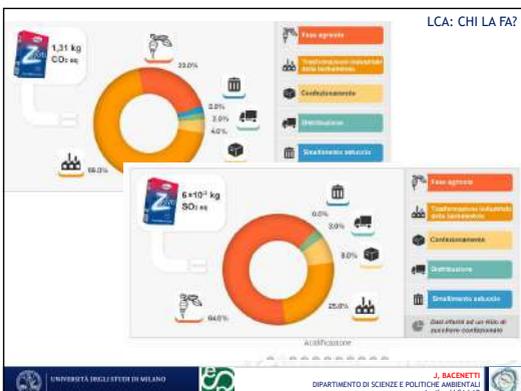


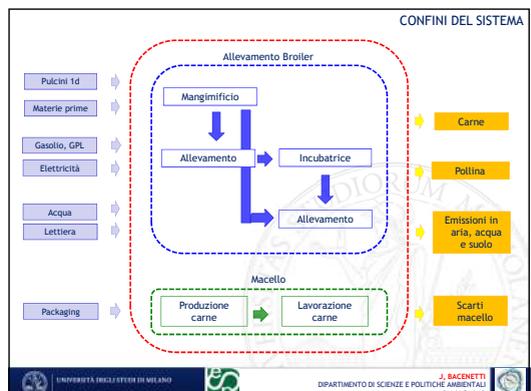
### LCA: CHI LA FA?

L'Unità Funzionale considerata nella EPD è: 1 litraggio di Mozzarella (comprensivo di imballaggio) onni defricato e riferimento a cui sono correlate le prestazioni ambientali dichiarate nel documento.

Processo	Produzione (kg)								
Arrivo latte crudo	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Pastorizzazione	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Waffelingamento	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Aggiunta del caglio	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

**J. BACENETTI**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB





### INVENTARIO

I dati di inventario sono stati raccolti mediante visite in azienda e analisi documentale (bollette, bolle di trasporto ecc. ecc.) e tramite un questionario inviato all'azienda

**Dati Primari** → direttamente rilevati (alimentazione, consumi energetici, produzioni, ecc.)

**Table 2**  
Impact of the main feed ingredients and portions (%) of ingredients in the feeding rations of the different chicken categories

Feeds	Country of origin	Amount (t/year)	Broilers		Roasters	
			Volume (%)	Broilers (%)	Volume (%)	Roasters (%)
Maize meal	Italy/France	214713	3.21	12.6	12.4	33.8
Soyabean meal (48% CP, var. DM)	Brazil	242348	6.02	2.89	14.1	42.9
Sunflower meal	France	9416	0.16	13.2	2.08	64.0
Wheat	Italy/France	94916	0.16	13.2	10.8	64.0
Sorghum	Italy/France	2300	2.28	18.1	13.3	55.8
Wheat bran	Italy	330	37.3	42.1		
Cultivar	Italy	330	380			
Corn meal	Europe	300	80.0			
Maize gluten meal	Italy	1000	5.34	13.9	18.9	58.4
Soyabean oil	Brazil	2000	0.48	14.1	10.2	42.2
Avanaid fat	Italy	2000	0.48	14.1	10.2	44.0

\* Heavy broilers.  
† Light broilers.  
‡ Dry Matter.

**Dati Secondari** →

- Le emissioni di metano (CH<sub>4</sub>), protossido di azoto (N<sub>2</sub>O) e ammoniaca (NH<sub>3</sub>) legate alla fase di allevamento sono state calcolate seguendo modelli di stima forniti da IPCC (2006) e EEA (2009), considerando le caratteristiche degli animali (PG, ISS...), della razione (% PG, digeribilità...), delle deiezioni (contenuto in Solidi Volatili, N...) e dei ricoveri (T, sistema di gestione della lettiera/pollina).
- I dati relativi alle emissioni legate alla produzione dei mangimi (compreso il consumo di input quali fertilizzanti e fitofarmaci), così come i consumi di elettricità, gasolio e macchinari, sono stati derivati da appositi database, e modificati considerando parametri sito-specifici.

Environmental impact assessment of an Italian vertically integrated broiler system through a Life Cycle approach  
© Giuseppe M. Neri, A. Scuderi, A. Tommasini, L. Boni, L. Cristofari

### ANALISI DEGLI IMPATTI

Conversione dei dati di inventario (LCI) in potenziali impatti ambientali (LCIA)

**CATEGORIE DI IMPATTO**

1. climate change (CC),
2. ozone depletion (OD),
3. human toxicity (HT),
4. photochemical oxidant formation (POF),
5. terrestrial acidification (TA),
6. freshwater eutrophication (FE),
7. terrestrial eutrophication (TE),
8. marine eutrophication (ME),
9. freshwater ecotoxicity (FET),
10. mineral, fossil and renewable resource depletion (MRFD).

J. BAGNETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### RISULTATI per 1 kg di CARCASSA

**Table 3**  
Environmental impact of the vertically integrated broiler system expressed as kg of carbon weight at slaughter broiler and as percentage contribution of each system phase.

Impact category	per kg CO <sub>2</sub> e	Contribution of the different phases (%)			
		Broiler	On-farm	Broiler farming	Feed production and packaging
Global warming	4.52	4.14	0.46	70.9	10.2
Acidification	1.87	1.36	0.51	88.1	2.9
Human toxicity	1.64	0.96	0.68	80.1	10.9
Terrestrial eutrophication	0.58	0.32	0.26	78.9	18.9
Non-renewable fossil energy	0.87	0.36	0.51	82.0	11.1

\* carcass weight.

**Mangimi principali responsabili dell'impatto ambientale nel caso del Riscaldamento Globale (Global Warming) si ha un forte impatto della sola importata a causa del Land Use Change.**

**Emissioni legate alla gestione della pollina impatto minore anche se non trascurabile soprattutto per l'acidificazione a causa delle emissioni di ammoniaca.**

Per kg di carcassa

Environmental impact assessment of an Italian vertically integrated broiler system through a Life Cycle approach  
© Giuseppe M. Neri, A. Scuderi, A. Tommasini, L. Boni, L. Cristofari

### RISULTATI per PESO VIVO e PER CATEGORIA

**Table 4**  
Environmental impact of broiler production, expressed per kg of live weight (LW) at finishing farm gate.

Impact category	per kg CO <sub>2</sub> e	Broiler production	
		Light broiler 1.6 kg LW	Roaster 2.0 kg LW
Global warming	3.73	3.73	3.84
Acidification	1.64	1.64	1.64
Human toxicity	1.64	1.64	1.64
Terrestrial eutrophication	0.49	0.49	0.49
Non-renewable fossil energy	0.87	0.87	0.87

\* Heavy broilers.

**Stretta correlazione (R<sup>2</sup> = 0.96) tra l'indice di conversione alimentare (o Feed Conversion Rate - FCR) e gli impatti ambientali (es. riscaldamento globale).**

Per kg di peso vivo

Environmental impact assessment of an Italian vertically integrated broiler system through a Life Cycle approach  
© Giuseppe M. Neri, A. Scuderi, A. Tommasini, L. Boni, L. Cristofari

### CONFRONTO CON LETTERATURA

Altri studi relativi all'allevamento convenzionale del broiler:

Autore (anno)	Nazione	Valore riportato per Climate Change
Da Silva et al. (2019)	Brasile	2,7 kg CO <sub>2</sub> e./kg peso vivo
Leinonen et al. (2012)	Regno Unito	4,41 kg CO <sub>2</sub> e./kg carcassa
Gonzalez-Garcia et al. (2014)	Portogallo	2,46 kg CO <sub>2</sub> e./kg carcassa
Bengtsson et al. (2013)	Australia	3,7 kg CO <sub>2</sub> e./kg pollo al consumo (arrosto)

Risultati variabili in letteratura, anche a causa di differenze metodologiche → unità funzionale, confini del sistema e input produttivi considerati (soprattutto inclusione emissioni LUC, effettuata solo da Leinonen et al.).

L'allevamento di broiler italiano presenta un impatto medio (5,52 kg CO<sub>2</sub>e./kg carcassa) superiore a quello degli altri studi perché:

- Inclusioni emissioni Land Use Change
- Una quota consistente (65%) della produzione totale analizzata deriva dalla macellazione di roaster (3,8 kg PV), che comporta un elevato consumo di mangime, per via sia della lunga durata del ciclo (53 gg) che di una peggiore Conversione Alimentare all'aumentare del Peso Vivo

Negli altri studi invece: { Peso alla macellazione: 1,7 - 2,8 kg  
Durata ciclo: 34 - 50 gg

J. BAGNETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### LCA PRODUZIONE DI UOVA BIO

Caso studio:  
Valutazione dell'impatto ambientale della produzione di uova da allevamento biologico

J. BAGNETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### DESCRIZIONE DELL'ALLEVAMENTO

L'azienda analizzata è localizzata in provincia di Udine (Friuli Venezia Giulia) e rispetta le norme per l'allevamento con metodo biologico




Parametro	Valore	Unità
Numero ovaiole	3000	
Durata ciclo produttivo	1,5	anni/ciclo
Vuoto sanitario	21	Giorni
Ventilazione	naturale	
Area capannone	500	m <sup>2</sup>
Area parcheggio esterno	12500	m <sup>2</sup>
Densità allevamento interna	6	galline/m <sup>2</sup> in capannone
Densità allevamento esterna	4	m <sup>2</sup> /gallina al pascolo

J. BACENETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
AgriFood LCA LAB

### DESCRIZIONE DELL'ALLEVAMENTO

Le ovaiole razzolano esternamente per la maggior parte delle ore di luce pur stazionando in prossimità del capannone

Nel capannone le ovaiole sono allevate a terra e si ha:

- un sistema di illuminazione con lampade,
- nessun tipo di ventilazione forzata (la ventilazione naturale si rivela sufficiente per movimentare l'aria)
- la raccolta delle uova avviene tramite un nastro trasportatore
- la lettiera è su sabbia




J. BACENETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
AgriFood LCA LAB

### OBIETTIVO DELLO STUDIO

Quantificare l'impatto ambientale della produzione di uova biologiche



COME?  
Con l'LCA (Life Cycle Assessment) ovvero l'analisi di tutto il ciclo di vita che caratterizza la produzione di uova biologiche



J. BACENETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
AgriFood LCA LAB

### SCELTA DELL'UNITA' FUNZIONALE

UNITA' FUNZIONALE: produzione di 1 kg di uova

ALLOCAZIONE TRA UOVA E OVAIOLE A FINE CICLO:  
Considerando che la massa di uova prodotta durante il ciclo è nettamente superiore a quella delle ovaiole a fine ciclo e tenendo conto dello scarso/nulla valore della carne di ovaiole, non è stato utilizzato alcun tipo di allocazione

Impatto della produzione di uova bio è ripartito al 100% sulle uova stesse

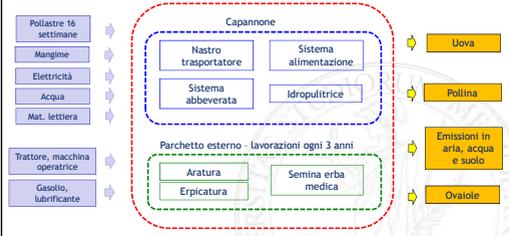




J. BACENETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
AgriFood LCA LAB

### CONFINI DEL SISTEMA

L'analisi è stata condotta con un approccio dalla -culla al cancello aziendale- considerando tutte le fasi della filiera dalla produzione dei fattori produttivi consumati (mangimi, ecc) fino alla produzione delle uova.



Disinfettanti ed eventuali farmaci sono esclusi dall'analisi così come le infrastrutture

J. BACENETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
AgriFood LCA LAB

### ANALISI DI INVENTARIO

L'inventario viene costruito sulla base di tutti gli input e output inclusi nel sistema, Dati Primari → direttamente rilevati, Dati Secondari → da database, stimati secondo modelli di stima o derivanti da letteratura

INPUT		
Acqua	700	l/giorno
Pollastre	3000	galline/ciclo
Peso pollastre	1,55	kg/capo
Trasporto pollastre	350	km a singola tratta
Sabbia per lettiera	2	m <sup>3</sup> /ciclo
Distanza di trasporto sabbia	< 10	km a singola tratta
Superficie distribuzione lettiera	3,5	ha
Superficie esterna per pascolo	12500	m <sup>2</sup>
Coltura per parcheggio esterno	erba medica	
Lavorazione terreno e semina	Una volta ogni 3 anni	
Elettricità (luce, motori alimentazione, motore traino nastro e motore impacchettamento)	600	kWh/mese
Mangime 1 (1-6 mesi)	18,5	% proteina grezza
Mangime 2 (6-18 mesi)	17	% proteina grezza
Consumo medio di mangime per capo	130	g/capo giorno
Uso idropulitrice	1	volta/ciclo

In questo caso studio, i dati sono stati raccolti tramite una intervista con l'allevatore da cui si è compilato un questionario

J. BACENETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
AgriFood LCA LAB

### ANALISI DI INVENTARIO: Mangimi

**Primi 6 mesi**  
**Mangime 18,5% PG**

Granello di mais	50 kg
Farina di soia	15 kg
Crusca di frumento	10 kg
Farina di frumento	10 kg
Farina di girasole	8 kg
Carbonato di sodio	5 kg
Germe di mais	1 kg
Farina di semi di lino	1 kg
Proteina grezza	18,4 %

**7-18\* mese**  
**Mangime 17% PG**

Granello di mais	56 kg
Farina di soia	12 kg
Farina di girasole	8 kg
Crusca di frumento	8 kg
Farina di frumento	8 kg
Carbonato di sodio	6 kg
Germe di mais	1 kg
Farina di semi di lino	1 kg
Proteina grezza	17%

**J. BACENETTI**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### ANALISI DI INVENTARIO: Dati secondari

**EMISSIONI:** stimate seguendo le Linee Guida dell'IPCC (2006, 2019):

$CH_4_{pollina} = n_i \cdot capi \cdot 365 \cdot SV \cdot B_{pollina} \cdot FCM = 100,4 \text{ kg}/(\text{azienda} \cdot \text{anno})$

Dove: SV = escrezione di Solidi Volatili(giorno\*capo) [stimata a sua volta in base a SSI e digeribilità razione]  
 $B_{pollina} = \text{max capacità di produzione } CH_4_{pollina} = 0,26 \text{ kg } (CH_4) \cdot \text{kg } (SV)^{-1}$   
 FCM = fattore di produzione del metano in base a T e sistema di gestione deiezioni = 1,5 %

$N_2O_{pollina} = N_{escreto \text{ tot}} \cdot \text{Fattore Emissivo } N_2O = 27,8 \text{ kg}/(\text{azienda} \cdot \text{anno})$

$NH_3_{pollina} = N_{escreto \text{ tot}} \cdot \text{Fattore Emissivo } NH_3 = 1203,5 \text{ kg}/(\text{azienda} \cdot \text{anno})$

Dove:  $N_{escreto \text{ tot}} = N_i \cdot capi \cdot 365 \cdot (N_{ingesta} - N_{residuo})$   
 $N_{ingesta} = SSI \cdot SPG / 6,25$  [SSI = Ingestione giornaliera di SSI]  
 $N_{residuo} = (IPG \cdot 2,8\%) + (\text{lovideposit} \cdot \text{peso uova} \cdot 1,85\%)$  [IPG = Incremento Ponderale Giornaliero]

Sono stati utilizzati fattori emissivi specifici per galline ovolate, e differenziati per le quote di N escreto su lettiera all'interno del capannone (70%) e nel pacchetto esterno (30%)

A partire dalla quota di N escreto nel pacchetto esterno, è stata calcolata anche la lisciviazione di  $NO_3^-$

**J. BACENETTI**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### ANALISI DI INVENTARIO

I dati di origine secondaria sono stati presi dal database specificamente sviluppati per gli studi di impatto ambientale

Normalmente l'inventario è un mix tra dati primari e secondari  
 Es, impatto ambientale legato al consumo di elettricità è dato dall'elettricità consumata (dato primario) per l'impatto della produzione dell'elettricità (dato preso da database)

**OUTPUT**

Uova	2700	uova/d
Peso uova	58	g/uovo
Uova rotte	1-2	%
Peso capi a fine ciclo	1.95	kg/capo
Pollina	distribuzione primaverile su mais	
Quantità pollina	40	l/anno
Distanza trasporto pollina	< 2	km

**J. BACENETTI**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### RISULTATI: IMPATTI ASSOLUTI

Per kg uova prodotte

Categoria d'impatto	Unità	Totale
Riscaldamento globale	kg CO <sub>2</sub> eq	1,562
Assottigliamento strato di ozono	mg CFC-11 eq	0,102
Tossicità umana effetti non cancerogeni	CTUH	5,13 x 10 <sup>-07</sup>
Tossicità umana effetti cancerogeni	CTUH	4,02 x 10 <sup>-08</sup>
Formazione polveri sottili	g PM2,5 eq	4,107
Formazione smog	g PMVOC eq	7,625
Acidificazione	molc H+ eq	0,168
Eutrofizzazione terrestre	molc N eq	0,746
Eutrofizzazione acque dolci	g P eq	0,548
Eutrofizzazione marina	g N eq	17,760
Ecotossicità acque dolci	CTUe	3,173
Consumo risorse minerali, fossili e rinn.	mg Sb eq	26,979

**J. BACENETTI**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### RISULTATI

**Mangimi principali responsabili dell'impatto ambientale** per tutti gli effetti gli ambientali valutati. Per 3 impatti le emissioni dalla pollina (ammoniacale soprattutto) sono responsabili di circa il 30-40%

**J. BACENETTI**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

### CONFRONTO CON STUDI PRECEDENTI

Autore (anno)	Nazione	Tipologia Allevamento	Valore riportato per CC [kg CO <sub>2</sub> eq/kg uova]	Land Use Change
Deklar et al. (2011)	Paesi Bassi	biologico	2,5	
		free range	2,7	escluso
		gabbia convenz.	2,2	
Leinonen et al. (2012)	Regno Unito	biologico	3,4	
		free range	3,4	incluso
		gabbia convenz.	2,9	
Pelletier (2017)	Canada	biologico	1,4	
		free range	2,4	
		gabbia convenz.	2,4	escluso
Abin et al. (2018)	Spagna	gabbia arricchita	3,4	incluso
		free range	1,6	
Wiedemann et al. (2011)	Australia	free range	1,6	escluso
		gabbia convenz.	1,3	

1,56 kg CO<sub>2</sub> eq/kg uova prodotte

- variabilità dovuta ancora in parte a differenze metodologiche, soprattutto per i confini del sistema considerati → inclusione/esclusione di LUC, fase di packaging, trasporto, ecc.
- generalmente nei sistemi di allevamento in gabbia si osservano ICA migliore (+ basso), minore mortalità e minori perdite di uova rispetto ai sistemi free range (→ maggiore efficienza produttiva e ambientale), ma esistono eccezioni dovute a particolari scelte di gestione aziendale, soprattutto legate all'alimentazione, o alle caratteristiche del sistema produttivo
- nel caso delle filiere biologiche l'uso di soia (e derivati) locali e, quindi, non importati dal Sudamerica consente di ridurre l'impatto sulle emissioni di GHG (gas serra) perché non c'è LUC (Land Use Change)

**J. BACENETTI**  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E POLITICHE AMBIENTALI  
Agrifood LCA LAB

CASI STUDIO: CONCLUSIONI

- In tutti gli studi la fase di allevamento è risultata la più impattante, in particolare per via delle emissioni legate alla produzione di mangime consumato.

- Nel caso delle uova, impatti inferiori (in particolare per il riscaldamento globale) delle produzioni con metodo biologico in particolare grazie all'utilizzo di soia e derivati della soia prodotti localmente dove non ha luogo il fenomeno del Land Use Change.



Per i broiler i migliori risultati si ottengono nei sistemi più intensivi in termini di durata del ciclo di allevamento → roaster italiano sempre «perdente» nei confronti di broiler leggeri

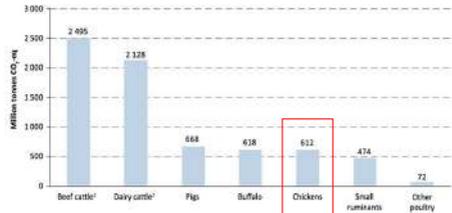


- Alcuni fattori produttivi non sono considerati nei confini del sistema (e quindi il loro impatto «sfugge» alla valutazione) perché mancano informazioni riguardo al loro processo produttivo nei database per studi LCA

- Non tutti gli aspetti sono valutabili con l'approccio LCA → Benessere animale, biodiversità

PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE ED EMISSIONI DI GHG TOTALI

FIGURE 2. Global estimates of emissions by species\*



\*Includes emissions attributed to edible products and to other goods and services, such as drought power and wood.  
<sup>1</sup> Producing meat and non-edible outputs.  
<sup>2</sup> Producing milk and meat as well as non-edible outputs.  
 Source: GLEAM.

PRODUZIONE AVICOLE E ALTRI ALIMENTI: KG DI CARNE DISSOCCATA



Impronta di carbonio

CONFRONTO CON LETTERATURA: carne di pollo e uova vs altre proteine animali

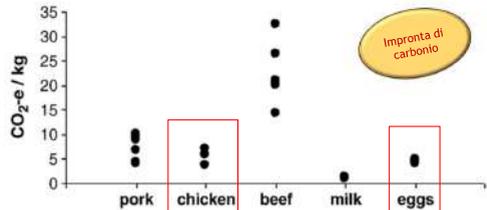
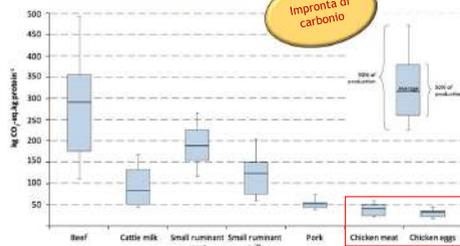


Fig. 5. Global warming potential for livestock products, in CO<sub>2</sub>-e expressed per kg of product.

Comparing environmental impacts for livestock products: a review of life cycle assessments (de Vries, 2010)

CARNE DI POLLO E UOVA VS ALTRE PROTEINE ANIMALI: kg di PROTEINA

FIGURE 3. Global emission intensities by commodity



Impronta di carbonio

Source: GLEAM

CARNE DI POLLO E UOVA VS ALTRE PROTEINE ANIMALI

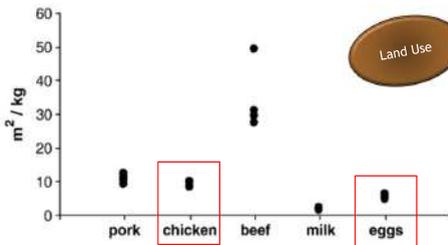


Fig. 1. Land use for livestock products (in m<sup>2</sup>/kg of product).

Comparing environmental impacts for livestock products: a review of life cycle assessments (de Vries, 2010)

CONCLUSIONI

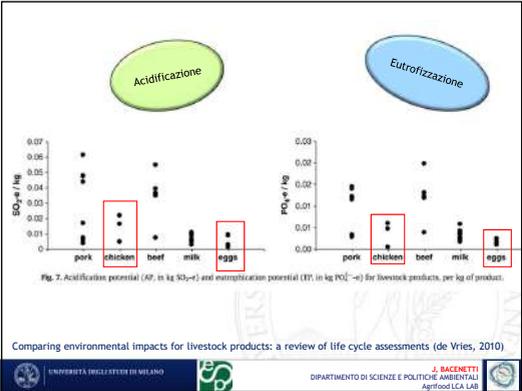
Tra i diversi alimenti di origine animale i prodotti del settore avicolo presentano impatti inferiori rispetto a quelli del settore suinicolo e bovino

Possibile riduzione degli impatti?

Azioni sinergiche tra:

- genetica... ottimizzano l'uso delle risorse a loro disposizione. Animali con un più basso ICA consentono di ridurre tutti gli impatti ambientali
- nutrizione, inclusione di nuovi ingredienti che attualmente sono antieconomici, sostituzione delle fonti proteiche (es. farina di lombrico, insetti, ecc.) e/o migliore profilazione degli animali durante i vari periodi del ciclo produttivo
- valorizzazione della pollina per finalità energetiche e/o ottimizzazione del suo impiego come fertilizzante,
- controllo delle condizioni ambientali di allevamento,
- sistemi di allerta precoce per patologie

Passaggio tra carni rosse e carni bianche comporterebbe una riduzione delle emissioni di gas ad effetto serra del 25-30% e una riduzione della mortalità per malattie cardiovascolari del 16%



Life Cycle Assessment in Agri-Food Chains

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

[jacopo.bacenetti@unimi.it](mailto:jacopo.bacenetti@unimi.it)

# VALORIZZAZIONE ENERGETICA DEGLI EFFLUENTI AVICOLI

Piccinini S., Garuti M.

Responsabili Settore Ambiente Centro Ricerche Produzioni Animali – CRPA

**ERACERCO** **GOI GasFreeHens**

VERONA, ITALIA  
29 GENNAIO - 1 FEBBRAIO 2020

Rassegna nazionale avicoltura

LIX Congresso Nazionale SIPA

L'Avicoltura: una zootecnica virtuosa?  
Sostenibilità della filiera avicola

Verona, 30 Gennaio 2020

**VALORIZZAZIONE ENERGETICA DEGLI EFFLUENTI AVICOLI**

Sergio Piccinini, Mirco Garuti

**CRPA**

Parametro	Unità di misura	Corsia di abbeverata	Corsia di alimentazione	Corsia di smistamento	Media
pH	[-]	7,7 ± 1,0	7,8 ± 0,6	8,0 ± 0,7	7,9 ± 0,5
Sostanza secca (ST)	[g/kg tq]	574 ± 100	772 ± 76	649 ± 114	659 ± 89
Sostanza organica (SV)	[g/kg tq]	459 ± 125	632 ± 73	599 ± 93	546 ± 78
Azoto totale (NTK)	[mg/kg tq]	33.406 ± 8.366	45.184 ± 4.440	36.228 ± 6.366	37.394 ± 4.973
Azoto ammoniacale (N-NH <sub>4</sub> )	[mg/kg tq]	5,9 ± 0,8	6,0 ± 0,7	5,9 ± 1,0	5,7 ± 0,6
Azoto organico (N <sub>org</sub> )	[mg/kg tq]	5.798 ± 2.635	4.277 ± 3.626	5.394 ± 1.745	5.000 ± 1.235
Densità letterina nel ricovero	[g/m <sup>3</sup> ]	27.607 ± 10.195	40.997 ± 4.398	30.836 ± 6.944	32.553 ± 5.744
		80,1 ± 12,8	90,3 ± 3,9	84,4 ± 6,5	85,5 ± 5,1
		64,8 ± 16,7	95,1 ± 9,8	57,5 ± 14,4	59,3 ± 9,9

Produzione sostanza secca: 5,5 kg ST/posto/anno (17% ceneri – 83% SV)

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020

Effluenti avicoli: pollo da carne (dati CRPA)

Parametro	Unità misura	Nastro non ventilato		Tunnel essiccazione	
		media	dev. Std.	media	dev. Std.
pH	[-]	7,1	0,2	7,7	0,7
ST	[g/kg tq]	347,0	73,8	730,4	151,2
	[%tq]	34,7	7,4	73,0	15,12
SV	[g/kg tq]	244,8	49,5	509,4	103,5
	[%ST]	70,1	2,1	69,0	2,0
NTK	[mg/kg tq]	22151	4047	36980	6755
	[%ST]	6,4	0,4	5,1	0,4
N-NH <sub>4</sub>	[mg/kg tq]	2946	539	2375	997
	[%NTK]	13,6	3,2	6,4	4,0

Produzione sostanza secca: 10,5 kg ST/posto/anno (25-30% ceneri, 70-75% SV)

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020

Effluenti avicoli: ovaiole (dati CRPA)

**Effluenti avicoli: tacchini (dati CRPA)**

Parametro	Unità misura	Letterina tacchino
pH	[-]	8,4 ± 0,2
ST	[g/kg tq]	536 ± 10
	[%tq]	53,6 ± 1
SV	[g/kg tq]	434 ± 9,8
	[%ST]	81 ± 1,2
NTK	[mg/kg tq]	20598 ± 1082
	[%ST]	3,8 ± 0,2
N-NH <sub>4</sub>	[mg/kg tq]	5256 ± 455
	[%NTK]	25,6 ± 2,5

Produzione sostanza secca: 15,5 kg ST/posto/anno (19% ceneri – 81% SV)

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020

**BMP- Potenziale metanigeno degli effluenti zootecnici (dati CRPA)**

	n	ST	SV	NTK	BMP	CH <sub>4</sub>	Smeq
	[-]	[%]	[% ST]	[% ST]	[Nm <sup>3</sup> /CH <sub>4</sub> /t SV]	[Nm <sup>3</sup> /t SV]	[t/100kg]
Pollina ovaiole	30	45,4 ± 2,1	61,1 ± 2,1	4,8 ± 1,1	287,9 ± 21,7	16,6 ± 1,9	0,78 ± 0,1
Letterina avicola	22	57,3 ± 16,1	61,9 ± 10,1	4,9 ± 0,4	250,7 ± 84,6	16,5 ± 2,1	1,08 ± 0,4
Liquame bovino	81	8,1 ± 2,1	71,8 ± 10,2	4,8 ± 1,1	290,9 ± 11,7	16,8 ± 2,1	0,17 ± 0,1
Letame bovino	49	22,2 ± 2,1	61,1 ± 2,1	2,9 ± 0,4	290,9 ± 11,7	16,8 ± 2,1	0,17 ± 0,1
Liquame bovino - solido separato**	27	21,2 ± 2,1	61,3 ± 14	1,9 ± 0,3	167,3 ± 11,9	15,1 ± 1,1	0,29 ± 0,1
Liquame bufalino	3	11,0 ± 2,1	79,7 ± 1,9	n.a.	218,0 ± 11,9	16,1 ± 1,1	0,19 ± 0,1
Letame bufalino	2	19,9 ± 2,1	74,8 ± 2,1	1,9 ± 0,3	227,0 ± 11,4	15,7 ± 0,4	0,19 ± 0,1
Liquame suino	17	4,9 ± 2,1	76,8 ± 7,2	6,2 ± 1,0	274,5 ± 11,5	16,7 ± 1,0	0,09 ± 0,1
Liquame suino - solido separato	13	11,9 ± 1,1	64,0 ± 1,1	2,7 ± 1,1	290,9 ± 10,2	16,1 ± 1,1	0,11 ± 0,1
Letterina suina	24	24,5 ± 1,1	64,1 ± 1,1	3,1 ± 0,1	258,9 ± 10,2	16,1 ± 1,1	0,48 ± 0,1
Letame curiale	3	24,3 ± 2,1	61,9 ± 2,1	1,4 ± 0,7	144,5 ± 20,8	14,2 ± 0,2	0,28 ± 0,1
Letame equino	7	34,5 ± 1,4	61,3 ± 2,1	1,4 ± 0,1	146,4 ± 10,6	14,2 ± 0,1	0,42 ± 0,1

Solidi totali (ST), solidi volatili (SV), azoto totale Kjeldahl (NTK), %CH<sub>4</sub> nel biogas, Silomais eq (Smeq): media e deviazione standard. n = numero di campioni

\*\* comprende campioni provenienti da allevamenti che utilizzano paglia e segatura come lettiera

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020

**La pollina come combustibile**

Combustibile	Potere calorifico (kcal/kg)	Potere calorifico (MJ/kg)
Carbone, Antracite	8.300	35,0
Carbone, Bitume	3.800-8.300	16,0 – 35,0
Carbone di legno di buona qualità	7.340	30,7
Legno	4.420-5.260	18,5 – 22,0
Letame essiccato	4.420	18,5
Pollina	3.490-3.820	14,6-16,0

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020

**Stima effluenti zootecnici prodotti in Italia (CIB, 2016)**

	Deiezioni totali	Da Bovini e bufalini	Da Suini	Da Avicoli
	(t)	(t)	(t)	(t)
ITALIA	128.654.188	93.540.425	31.479.759	3.634.005
NORD	92.364.152	62.720.998	26.606.764	3.036.390
CENTRO	10.800.864	8.227.152	2.343.864	229.848
SUD	25.489.172	22.592.275	2.529.131	367.766

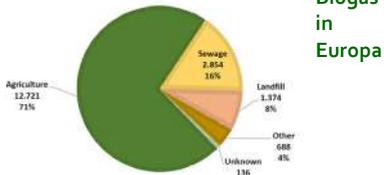
Fiera Verona, 30 Gennaio 2020

**Filiera Biogas/Biometano: il contesto europeo**

- Gli obiettivi dell'Unione Europea rispetto alle fonti rinnovabili (RED II) sono ambiziosi sia per quanto riguarda gli usi energetici che per l'uso nei trasporti. In particolare per il comparto del trasporto, al 2030 dovrà essere prodotto da fonti rinnovabili il 14% della quota di carburanti utilizzati (il 3,5% come biocarburanti avanzati). Il biometano riduce le emissioni complessive di gas serra rispetto a quelle dei carburanti fossili e può, quindi, contribuire in modo significativo al raggiungimento degli obiettivi europei.
- La filiera biogas/biometano è fortemente rappresentata in Europa con 17-783 impianti di biogas, per 10.532 MWeI installati, e 540 impianti di biometano, per una produzione annua di circa 1,9 miliardi di m<sup>3</sup> di biometano (European Biogas Association, 2018).

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020

Figure 3 Distribution of Biogas Plants by Feedstock in Europe\* in 2017 (number of plants)



## Biogas in Europa

\*EU28 + Switzerland + Norway + Serbia (European Biogas Association, 2018).

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



## La filiera Biogas/Biometano: il contesto italiano

- Nel settore biogas, l'Italia si colloca al quarto posto al mondo dopo Germania, Cina e Stati Uniti, con circa 2.140 impianti operativi, di cui circa 1.650 nel settore agricolo e 490 nel settore rifiuti e fanghi di depurazione, per un totale di circa 1.450 MWel installati, di cui quasi 1000 nel settore agricolo (fonti GSE e TERNA). Per il settore del Biometano, però, l'Italia è solo all'inizio, infatti è del 2 marzo 2018 il Decreto Ministeriale che rappresenta il passaggio fondamentale per lo sviluppo della filiera del biometano nel nostro paese.
- Il potenziale di sviluppo della filiera biogas/biometano nel breve/medio termine è consistente: stime del CIB-Consortio Italiano Biogas identificano un potenziale produttivo al 2030 di 8-10 miliardi di m³ di biometano, pari a circa il 11-13% del consumo attuale di gas naturale in Italia e superiore all'attuale produzione nazionale.
- L'Italia è leader in Europa per i veicoli a metano, con oltre 1 milione di mezzi e 1,1 miliardi di m³ di metano utilizzati.

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



Fonte GSE: Rapporto Statistico 2018	2015	2016	2017	2018
	n°	MWe	n°	MWe
<b>TOTALE BIOGAS</b>	<b>1924</b>	<b>1405,9</b>	<b>1995</b>	<b>1423,5</b>
- Biogas da rifiuti urbani	380	399,0	389	401,3
- Biogas da fanghi depurazione	78	44,4	77	44,2
- Biogas agricolo (*)	1466	962,5	1529	978
TOTALE BIOENERGIA	2647	4056,5	2735	4124,1
			2913	4135,0
			2924	4180,4

(\*)Biogas da effluenti zootecnici, residui agricoli ed agroindustriali, colture energetiche

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



## Biogas in Italia



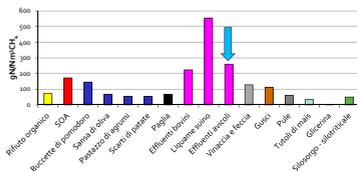
## Distribuzione regionale della produzione italiana biogas, 2018 (Dati GSE, dicembre 2019)

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



## Apporto di azoto dalle biomasse

La composizione chimica delle biomasse influenza il processo di DA e le caratteristiche del digestato



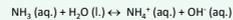
Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



## Ammoniaca / ione ammonio

Si produce per deaminazione degli aminoacidi.

Esiste un equilibrio in ambiente acquoso tra le due forme chimiche che dipende dal pH, dalla temperatura di processo e dalla concentrazione di NH₄⁺.



L'inibizione batterica è causata dalla concentrazione di ammoniaca libera (NH₃) ma dal lato pratico si misura l'azoto ammoniacale nel digestato (N-NH₄⁺).

**Valori al di sotto di 3000 mg/kg di N-NH₄⁺ non sono inibitori per la digestione anaerobica in ambito agro-zootecnico.**

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



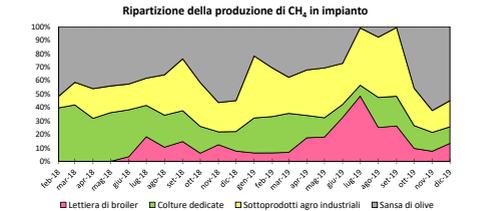
Un esempio di impianto biogas agro-zootecnico che usa effluenti avicoli  
Un esempio di adattamento dei microrganismi



Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



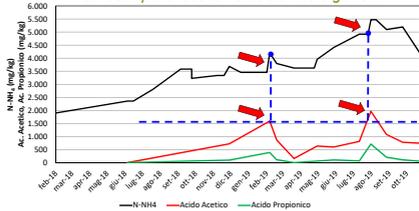
Un esempio di impianto biogas agro-zootecnico che usa effluenti avicoli  
Un esempio di adattamento dei microrganismi



Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



Un esempio di impianto biogas agro-zootecnico che usa effluenti avicoli  
*Un esempio di adattamento dei microrganismi*



Fara Verona, 30 Gennaio 2020



Un esempio di impianto biogas agro-zootecnico che usa effluenti avicoli  
*Il problema dei sedimenti nei digestori*

IMPIANTO DI BIOGAS da 250 kWe alimentato con le seguenti biomasse solide: silomais 38%, silotriticale 43%, sottoprodotti di cereali 2,5%, sansa di olive 5%, letame bovino 10%, pollina da ovaiole 1,5% (dati espressi p/p)



Dopo 5 anni di funzionamento si è reso necessario eliminare il sedimento presente nel digestore.

E' stato quantificato che circa il 10-15% in peso del sedimento del digestore sia dovuto a grit di dimensioni con diametro tra 1-2 mm proveniente da pollina da ovaiole.

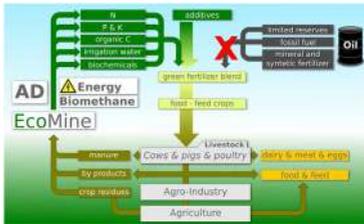
COME CARATTERIZZARE IL SEDIMENTO?  
 Analisi granulometria + osservazione al microscopio

Fara Verona, 30 Gennaio 2020



Biogas e EcoMine

Nell'ottica di un modello di economia circolare gli scarti e sottoprodotti, diventano risorsa



Fara Verona, 30 Gennaio 2020



Impianto aziendale: DA+S/L+ Essiccamento +Strippaggio (in collaborazione con BTS)



Digestori  
 S/L+Essiccamento  
 Solido finale

Impianto biogas da 1MWe alimentato con liquame suino, effluenti avicoli, insilati di cereali.  
 Strippaggio



Esempio impianto di co-digestione pollina in Slovenia

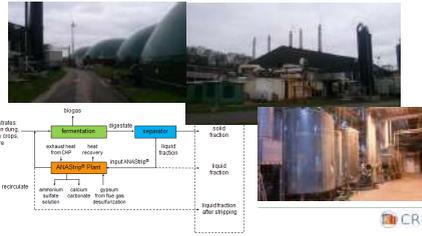


2 digestori orizzontali 2x80 m<sup>3</sup> x 2  
 1 post digestore 4800 m<sup>3</sup>  
 1 CHP 1 MWe  
 Post trattamento digestato: strippaggio per evaporazione sottovuoto  
 Alimentazione (50 t/d): Pollina (55%) + silomais + fango di flottazione macello avicolo + acqua

Fara Verona, 30 Gennaio 2020



Esempio impianto di co-digestione pollina (4 MWe + 500 m<sup>3</sup>/h biometano) in Germania (Ottersberg, Brema) con strippaggio ammoniac (ANAStrip®, 2011)



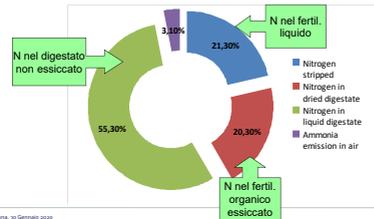
Essiccazione Digestato



Fara Verona, 30 Gennaio 2020



Essiccazione Digestato: bilancio azoto imp. Biogas 1 MWe, Eff.zoot. (30%) + (70%) colture energetiche, 19000 t digestato/anno



Fara Verona, 30 Gennaio 2020



**LETTIERA AVICOLA ESAUSTA = OTTIMA BASE ORGANICA PER LA PRODUZIONE DI FERTILIZZANTI ORGANICI**

**1. TRATTAMENTO COMBINATO CON ALTRI SCARTI ORGANICI SELEZIONATI**

Aggiunta del 20-30% in miscele di scarti organici vari in **IMPIANTI DI COMPOSTAGGIO** con **PRODUZIONE DI AMMENDANTI ORGANICI**.  
 Arricchimento in N e P del prodotto finito.

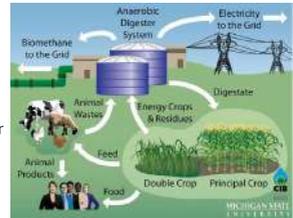
**2. TRATTAMENTO IN "PUREZZA"**

**TRATTAMENTO SEMPLIFICATO IN IMPIANTI DEDICATI** ("compostaggio statico ad aerazione passiva") con produzione di **COMCIMI ORGANICI NP**

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



Le aziende agricole continuano a produrre cibo e mangime ma producono anche biomassa addizionale per produrre biogas. Il modello promuove la qualità del suolo e il sequestro di carbonio.



Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Tipologie di impianti termochimici**

- impianti di combustione
- impianti di gassificazione
- impianti di pirolisi

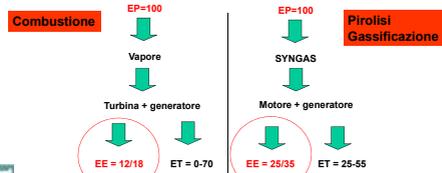
I problemi di base sono i seguenti:

- effettiva disponibilità delle tecnologie e loro affidabilità
- utilizzo dell'energia (= sua valorizzazione)

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Tipologie di impianti termochimici: confronto rese energetiche**



Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Tipologie di impianti termochimici**

**Per Effluenti avicoli**

Impianti di combustione → Tecnologia matura

Effettiva disponibilità

Costi di investimento significativi - effetto di scala

Impianti di gassificazione/pirolisi → tecnologia emergente

scala pilota/dimostrativa

sistemi non pienamente industrializzati

fornitori non in grado di assicurare prestazioni

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Combustione effluenti avicoli: il problema delle emissioni**

Vanno rispettati dei precisi limiti che riguardano

- polveri
- ossidi di azoto
- altri composti

**NELLE CONDIZIONI CONTRATTUALI DEVE ESSERE INCLUSO IL RISPETTO DEI LIMITI DI EMISSIONE NELLE DIVERSE CONDIZIONI DI FUNZIONAMENTO**

**ATTENZIONE ALLE CARATTERISTICHE QUALITATIVE DEI PRODOTTI CONFERITI PER LA VALIDITA' DELLE GARANZIE**

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Combustione: numero minimo di animali**

Per impianti da 6 MWt installati occorrono:

- circa 2.000.000 posti pollo carne
- circa 700.000 posti tacchino
- circa 1.000.000 posti ovaiole

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Prove co-combustione di lettiera avicola c/o impianto combustione biomasse Tampieri Energie (100 MW)**

Sono state condotte due prove di 3 giorni ciascuna in due annualità in cui al tradizionale combustibile (Farina di vinacciolo, farina animale e vinaccia umida esausta) sono state sostituite diverse aliquote di lettiera avicola:

	1° annualità		2° annualità	
	In peso	In ST	In peso	In ST
1° giorno	5%	3%	14%	10%
2° giorno	10%	6%	18%	12%
3° giorno	15%	10%	23%	16%

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Prove co-combustione di lettiere avicole presso Tampieri Energie:  
Risultati**

- le performances produttive dell'impianto sono risultate in linea con il periodo preso a riferimento;
- non sono state rilevate incrostazioni della camera di combustione;
- le emissioni in atmosfera sono state controllate dal sistema di abbattimento presente in impianto e sono risultate entro i limiti prescritti;
- valori di diossine, furani ed IPA sono risultati leggermente superiori agli standard aziendali, ma notevolmente inferiori ai limiti normativi.

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Conclusioni**

- Attualmente la "valorizzazione energetica" degli effluenti avicoli è praticabile con la co-digestione anaerobica (in crescita) e/o la co-combustione assieme ad altre biomasse (non diffusa).
- Da perseguire la "valorizzazione di materia" con la produzione di fertilizzanti organici NP, sia tramite Compostaggio che Digestione Anaerobica + essiccamento /evaporazione/strippaggio.

Fiera Verona, 30 Gennaio 2020



**Industrial Research**



Laboratories for Industrial Research  
High Technology Network in Emilia-Romagna Region  
**ENERGY & ENVIRONMENT DEPARTMENT**

- Chemicals analysis of agriculture feedstocks/byproducts for their energy and environmental valorization.
- Biochemical Methane Potential test in bioreactors (batch and continuous fermentations).
- Evaluation of pretreatment technologies and post-digestion systems for nutrients recovery.



VERONA, ITALIA  
29 GENNAIO - 1 FEBBRAIO 2020



Rassegna nazionale avicoltura

LIX Congresso Nazionale SIPA

L'Avicoltura: una zootecnia virtuosa?  
Sostenibilità della filiera avicola

Verona, 30 Gennaio 2020



Grazie per l'attenzione

[s.piccinini@crpa.it](mailto:s.piccinini@crpa.it)  
[www.crpa.it](http://www.crpa.it)





## SUSTAINABILITY AND THE POULTRY INDUSTRY

Burnside T.

*Aviagen Group, Global Manager Welfare and Compliance*

With a growing world population and per capita resources to produce food declining, sustainable poultry production is of great importance. The future outlook for the global poultry meat market indicates that poultry meat will contribute about 50% of the additional meat production and consumption in the next decade and will constitute the largest share of additional per capita consumption at the global level. In this context, the relative lower environmental impact of poultry production contributes to the sustainability of food production globally. Food safety and food security, and animal health and welfare also contribute to the sustainability of poultry production. In addition, with a more discerning customer we see more emphasis on choice and a focus on where food comes from – agriculture is moving from producer to consumer markets.

Sustainability as defined by the Brundtland group is meeting the needs of the present without compromising the ability of future generations to meet their own needs – they are the balance of environmental, social/ethical and economic aspects. The UN have defined 17 Sustainable Development Goals (SDGs) to stimulate the world to ensure global food sustainability by 2030. Burnside will illustrate how the meat poultry sector has defined how they can make a difference for the environment, society and the economy, subsequently linked these to the UN SDGs and identified 5 top SDGs where there is major impact, and actions for the industry. The work has resulted in the joint FAO-IPC Declaration of São Paulo.

Burnside will highlight/explain where poultry breeding can make and has made a difference for sustainability, and how Aviagen has linked its Top 5 Commitments to the IPC top SDGs.



## TRENDS IN POULTRY SUSTAINABILITY AND WELFARE

Opengart K., DVM, PhD, DACPV

*Vice President, Animal Welfare and International Sustainability  
Tyson Foods*

### INTRODUCTION

It has been estimated that the 7.3 billion people on earth today consume 1.5 times what the earth's natural resources can provide. By 2050, the world's population is expected to reach 9 billion and the demand for food will double. The world must produce more food in the next 40 years than it has in the last 8,000 years. As the world's population continues to grow and its finite resources are used to support the increasing demand for animal protein, it becomes more important that we, those responsible for the agricultural sector, work diligently to use science and technology to sustainably address the seemingly competing interests – feeding more people utilizing a resource-intense production system but doing so much more efficiently. (UN Sustainable Development Goal 2). (<https://sustainabledevelopment.un.org/sdgs>).

### SUSTAINABILITY

Historically, sustainability has been defined as the maintenance of an ecological balance by the avoidance of the depletion of natural resources. This is very much a definition focused on environment and conservation of resources. More broadly, the U.N. World Commission on Environment and Development has defined sustainable development as “development that meets the needs of the present without compromising the ability of future generations to meet their own needs.” As sustainability has continued to develop conceptually and be accepted and incorporated as an operational principle within the framework of organizations, its scope has grown to include environment, ethics and economics, often referred to as the 3Es. Today, sustainability's scope is more commonly referred to as ESG – environment, social and governance and the core principle of sustainable development aims to balance environmental, economic and social interests. Organizations that act responsibly in these areas, are afforded the social license to operate and are generally considered to have strong social conscience and institutional governance .

Tyson Foods' approach to sustainability is multi-dimensional. For our business, we have identified five core sustainability focus areas: food, animal welfare, environment, workplace and community. For Tyson, these are aligned with and support our broader definition of sustainable agriculture - meeting the needs of today while enhancing the ability of future generations to have their needs met, increasing productivity to meet future food demands with high quality, safe and affordable products, reducing the impact we have on the environment, improving human and animal health and welfare and improving the social and economic well-being of agricultural communities. We seek answers that improve outcomes across all focus areas, understanding that key sustainability initiatives may be interconnected.

Effective sustainability initiatives should be characterized as being science-driven, outcomes-based, technology-neutral and transparent. The intention is that this integrated strategy will drive improvements in all areas of sustainability at an accelerated rate by approaching them in a holistic way, considering and weighing all of the potential impacts and consequences of each decision made.

With such a broad scope, it is important that we understand and define what sustainability means for our business so that every individual understands the concept and the contributory role they play in delivering sustainable business outcomes for the company. In the simplest terms, if, in the course of doing their job, regardless of where they sit within the organization, an individual mitigates risk or captures opportunity, they are contributing to sustainable business outcomes. This can be applied to animal welfare, live operations, processing, food safety and quality, finance, human resources, employee health and safety, environmental management or any other area within the operation. This simple definition helps people understand that they are important to the company's success, have a valuable role in the sustainability of the company and that sustainability is defined more broadly than the environment and conservation of resources.

## **POULTRY SUSTAINABILITY**

For the purposes of this presentation, the discussion will focus on the most significant sustainability issues that we face in the poultry industry which, incidentally, fall within the environmental and animal welfare focus areas. Before we discuss the areas that are hot topics today relative to poultry sustainability, it is worth reviewing and acknowledging the progress we have made as an industry over the last decades. All too often, we have not taken credit for the advances we have made as an industry to produce increasing quantities of high quality, affordable and safe protein with fewer input resources needed. We have been able to accomplish this while overall health and welfare of the collective broiler flock has improved. What we have not done as well, is to transparently communicate our story; our progress, our challenges and our successes.

The primary factors that have been associated with improving the footprint of poultry production include genetics, nutrition, housing/equipment and in-house management. The work of the primary breeders has not only been focused on improving performance traits such as rate of gain, feed conversion and meat yield; they have done an excellent job balancing those traits with important health and welfare traits like immune function, specific disease resistance, cardiovascular integrity and leg strength. Ongoing research in poultry nutrition, improvement in ingredient quality, a better understanding of how to use alternative ingredients and the practical application of this knowledge by technically-skilled nutritionists has made it possible to capture and optimize the genetic potential of today's broiler. Housing and equipment have improved over the last several decades as well. Today we are constructing better quality and better engineered poultry houses that are more energy efficient, are better at delivering optimal internal environmental conditions, mitigate external environmental conditions and are more biosecure. Our ability to provide better in-house management allows us to capitalize on the improvements in genetics, nutrition and infrastructure. We have the ability to better protect the broiler from disease with

biosecurity and health management programs and better understand the environment that creates the best conditions for optimal welfare, health and performance. It is only when we are capturing all of the opportunity (genetic, nutritional, environmental, welfare) and mitigating the risks that we operate with the best sustainable outcomes.

Of all the factors that we consider in producing sustainable poultry, there is none greater than feeding and nutrition. Sixty to Seventy percent of the environmental impact of the poultry production system comes from production of grain and finished feed - activities associated with production of feed grains including use of nitrogen-based fertilizer, deforestation as well as feed processing and transport. Recognizing the significance of these factors, land stewardship programs, like Tyson Foods' 2,000,000 acre commitment, are being developed to positively impact row crop farming and soil health practices as part of organization's commitment to environmental sustainability. Additionally, companies are developing forest protection (deforestation) policies that are designed to eliminate deforestation associated with the production of agricultural commodities like beef, soya, palm oil and timber. Based on these policies, companies have begun to source these commodities from no- or low-risk areas for deforestation or have included responsible sourcing requirements within their procurement programs which include 3<sup>rd</sup>-party certification that the commodities are sustainably produced. The implementation of land stewardship programs and execution of deforestation policies not only have direct impact on how land is used and maintained, but these activities are also directly tied to important greenhouse gas reduction goals, i.e. carbon sequestration, reduced fertilizer use.

While there are opportunities to improve the sustainability of how feed grains are produced, there are also opportunities to improve the conversion of grains to animal protein. Any improvement we can collectively make in how feed is manufactured and utilized by the bird will have significant impact on reducing the carbon footprint of the poultry supply chain. It shouldn't be a surprise, therefore, that efforts to (a) continue to capture the year-over-year improvements the primary breeders deliver in feed conversion, (b) improve feed efficiency with the use of feed supplements or management techniques and (c) evaluate the use of alternative ingredients that have lower greenhouse gas (GHG) potential than corn or soya continue to receive very focused attention. Additionally, lowering feed conversion has the added environmental benefits of reducing water usage and waste (manure) production. While today we formulate on ingredient cost and availability and desired performance, it may not be long before we also incorporate the direct environmental impact of specific feed ingredients when making decisions on which ration to feed. In fact, today, in some geographies, inclusion of enzymes in feed formulation is a decision based on both economic and environmental factors.

Without the ability to measure key indicators, we lack the ability to demonstrate progress and communicate the positive story the poultry industry has to tell. Among terrestrial animals, poultry has the best conversion rate of feed to meat or eggs and the most favorable environmental footprint in terms of water and energy used per kg of protein produced. Williams et al. (2009) conducted a broiler life cycle analysis

and concluded that it is the most resource-efficient meat production system, mostly due to nutritional efficiency and progress in genetics. Fortunately, we have examples of metrics that help illustrate improvements over time. Industry data from the U.S. broiler industry provided by Agri-Stats, an industry-wide reporting and benchmarking service representing over 95% of the industry (~160,000,000 broilers per week), shows significant trends over time indicating that we have been able to reduce feed conversion (input), increase meat yield (output) and reduce mortality and condemnation (waste) and improve welfare. This is an incredible sustainability story that has not been communicated well to our stakeholders and, one could say, has been mis-communicated by those who oppose organized, large-scale agriculture. While the Agri-Stats information provides evidence of improved production metrics, it is important that we begin to equate and communicate these metrics as more broad, higher level impacts. As an example, Thoma *et al.*, (2016) evaluated improvements in environmental metrics associated with the U.S. broiler industry between 1965 and 2010 by conducting a life-cycle analysis and found 53% reduction in water depletion, 71% reduction in land occupation, 38% reduction in fossil energy use and 32% reduction in global warming potential per kg of live broiler mass, ready for transport, at the farm gate.

In the future, we will have to improve not only the method and content of communication provided to stakeholders, but we will have to express progress in terms that are more meaningful to greater numbers of stakeholders, i.e, improvements in feed conversion expressed as a reduced impact on the environment (benefit to all) as opposed to a more efficient cost of production (benefit to industry). As mentioned previously, it will also be important to communicate that sustainability efforts need to be holistic and balanced in approach; taking multiple factors into account, communicating the advantages and disadvantages of a particular path and transparently communicating progress and opportunities along the way.

## **POULTRY WELFARE**

A prime example of how overall sustainability in the poultry supply chain can be derailed when not considering the holistic nature of system requirements is animal welfare. Mandating specific resource-based requirements like stocking density or breed choice based on growth rate does not necessarily guarantee improved animal welfare outcomes but does increase system inputs like feed usage and housing needs. The mounting pressure to implement these types of requirements is often delivered without consideration for what the overall impact is to the poultry footprint. While it is easy to make a statement that slow growing birds deliver better welfare outcomes and that should be the justification to make a breed change, it is more complicated when all factors are considered with equal weight. As an example, based on publicly available information from the primary breeders and our own internal numbers, we modeled the performance and environmental impacts of both conventional broiler performance compared with a commercially available slower growing strain of broiler. From a performance standpoint, the slower growing strain required 12 more days to reach target weight, had 27% higher feed conversion and produced 39% less white meat yield. The environmental impact of using a slower growing strain based on our model showed that white meat yield per acre of land used for corn and soya

production was reduced by 57%, water use per pound of live weight increased by 27%, total manure production increased by 76% and GHG emissions increased by 39%. While this model does not address the welfare impact of changing breeds, it does illustrate the other significant consequences of making a breed change. Our goal as poultry professionals should be to continue to deliver improved sustainable environmental, welfare and business outcomes utilizing the advances in genetics, nutrition and management to fuel progress.

Relative to welfare, Tyson Foods' commitments are to focus on those factors that improve welfare outcomes rather than defining system inputs or requirements, holistically evaluate the impact of proposed approaches, practices or technology that have potential welfare benefits and, ultimately, demonstrate improved welfare outcomes while best managing cost of resource-related requirements and overall impact to the environment.

To address the most challenging welfare questions, we employ an applied research approach which places our animals in environments that allow for their expression of preference. We use this science-based approach to evaluate the impact of the different choices on measurable outcomes. This approach is used to define/refine standards to drive continuous improvement in outcome-based measures of welfare and works well when attempting to address behavioral questions. Tyson Foods is currently using this approach to evaluate enrichments, lighting, stocking density and flooring systems. By allowing the birds to express their preference, we feel we are able to better justify making changes that have demonstrated meaningful welfare outcomes and avoid the traps of committing to welfare requirements that are difficult to implement and have no, or potentially negative, welfare impacts.

## **CONCLUSION**

In the future, we will need to produce food more efficiently using fewer resources. Production of and demand for animal protein will be influenced by competition for resources, socio-cultural factors, climate change, ethical concerns and advancements in technology. Although not previously mentioned, the issue of food waste must also be effectively addressed. It is estimated that 30-50% of food in developing countries is not consumed. Combined with post-harvest losses of plant foods, the combined loss could feed approximately 3,000,000 people and would significantly ease the current food security issue while new technology and sustainable practices are put into place.

Continued progress in producing sustainable poultry will require the adoption of new biotechnology which will bring advances in crop resilience, yield and nutrient content as well as improvements in nutrient utilization, health and welfare traits, and food safety and quality of poultry. Precision agriculture practices will deliver more precise management of resources such as soil, water and fertilizers; more effective control of pests and diseases; improved crop and livestock production practices; better mitigation of the effects of environmental stressors; and improved post-harvest technology, including food safety and waste management. Global adoption and transfer of technology and education will be necessary to improve availability of sustainable poultry, ultimately, increasing food security (Bryden, 2017).

Advances will only occur if concurrent social policy and public acceptance are developed. Multi-stakeholder organizations like the newly formed U.S. Roundtable for Sustainable Poultry and Eggs (<https://www.us-rspe.org/>) and the International Poultry Welfare Alliance (<https://www.poultrywelfare.org/>) will ensure alignment between the different constituencies within the poultry value chain. A significant amount of time will need to be devoted to communication and education of the benefits that will be derived from the incorporation of new and properly tested technologies. The fact that the population today is far-removed from where their food comes from and how it is produced will be an ongoing challenge. Without broad consumer acceptance and supportive national and international government policies, meeting the growing demand for more sustainably produced poultry will continue to be a challenge.

## **REFERENCES**

1. Bryden, W.L. A more sustainable poultry production. *Zootecnica International*. October 20, 2017. <https://zootecnicainternational.com/poultry-facts/sustainable-poultry-production/>
2. Thoma, G., Matlock, M and B. Putnam. A Retrospective Analysis of US Poultry Production: A Comparative Lifecycle Assessment of US Broiler Production for Years 1965 and 2010. International Production and Processing Expo. January 26th, 2016.
3. Williams, A.G., Audsley, E. and D.L. Sandars. A Lifecycle Approach to Reducing the Environmental Impacts of Poultry Production. Proceedings and Abstracts, 17th European Symposium on Poultry Nutrition. S4.1, pp. 7. 2009.

## **OTHER RESOURCES:**

1. Mottet, A., and G. Tempio. Global Poultry Production: Current State and Future Outlook and Challenges. *WPSJ*. 73:245-256. 2017.
2. Vaarst, M., Steinfeldt, S., and K. Horsted. Sustainable Development Perspectives of Poultry Production. *WPSJ*. 71:609-620. 2015.

**ATTI DEL V SIMPOSIO SCIENTIFICO**

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Online, 12 e 19 Novembre 2020



## CARATTERIZZAZIONI GENOTIPICHE E FENOTIPICHE DI CEPPI DI *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* ISOLATI DAL POLLAME IN ITALIA

Bano L.<sup>1</sup>, Cornaggia M.<sup>1</sup>, Di Castri A.<sup>1</sup>, Zandonà L.<sup>1</sup>, Rizzardi A.<sup>1</sup>, Zarpellon G.<sup>1</sup>, Guolo A.<sup>1</sup>, Ferro T.<sup>1</sup>, Moschioni C.<sup>1</sup>, Tonon E.<sup>1</sup>, Bacchin C.<sup>1</sup>, Ceruti R.<sup>2</sup>, Giovanardi D.<sup>3</sup>, Catania S.<sup>4</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Batteriologia Speciale, Villorba, Treviso

<sup>2</sup> Laboratorio Gesco S.C.A., Cazzago San Martino, Brescia

<sup>3</sup> Laboratorio Tre Valli, San Martino Buon Albergo, Verona

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Verona

### Summary

In this study, we characterized 98 strains of *Riemerella anatipestifer* (RA), isolated in Italy from commercial (n. 82) and backyard (n. 16) poultry flocks, in a 7 years period (2012-2018).

Phenotypical analysis demonstrated that 89.7% of the isolates were serotype “1”, 3% serotype “18”, 1% serotype “13”, 6.3% resulted untypable strains.

All the Italian RA strains belonged to 13 new sequence types (STs), genetically distant from the Asian ones. In 2013 a new sequence type, ST 46, appeared simultaneously in different commercial flocks of turkeys and in few years it became the most prevalent ST circulating in Italy. PFGE characterization showed that most of ST 46 strains were clones or genetically strictly related. In duck flocks ST 52 and ST 54 and, sporadically, ST 46 were detected.

How ST 46 appeared simultaneously and become the prevalent ST in Italian turkey commercial flocks in few years, still remain to be elucidated.

### INTRODUZIONE

*Riemerella anatipestifer* (RA) (precedentemente nota come *Pasteurella anatipestifer*), è un cocco-bacillo Gram negativo, immobile, catalasi e ossidasi positivo, appartenente alla famiglia delle *Flavobacteriaceae* e al genere *Riemerella*, che comprende solo altre due specie: *Riemerella columbina* e *Riemerella columbipharingys*, isolate solo da specie aviarie (Vancanneyt *et al.* 1999; Rubbenstroth *et al.*, 2013).

La prima segnalazione di tale microrganismo risale all'inizio del secolo scorso, associata primariamente ad una polisierosite degli anatidi (Riemer, 1904). Oggi la malattia è da considerarsi cosmopolita anche se il maggiore numero di segnalazioni proviene dal continente asiatico su anatidi.

In Italia la malattia è stata descritta per la prima volta nel 1979 in tacchini da carne di 70 giorni, e in polli da carne di 40-50 giorni (Pascucci *et al.*, 1981). La sintomatologia nel tacchino era caratterizzata da paralisi delle ali e delle gambe, opistotono, torcicollo, ribaltamento, cecità e mortalità del 20%. Nel pollo la sintomatologia era inizialmente respiratoria, subito seguita da forma neurologica con tremori, movimenti scoordinati del capo e tassi di mortalità compresi tra il 3% e il 5%. Successivamente sono stati osservati anche quadri di zoppia dovuti a localizzazione articolare del patogeno e conseguente artrite (Giovannetti e Pascucci, 1983). Nell'ultimo decennio si è assistito a delle ondate epidemiche che hanno avuto il loro apice nel 2015, anno in cui si è ricorso anche a

immunizzazione massiva di gruppi di tacchini con vaccini stabulogeni. La sierotipizzazione di RA ha subito diverse rivisitazioni negli anni passando dall'assegnazione di lettere a quella di numeri. Attualmente sono noti 21 sierotipi di RA, anche se non c'è accordo nel mondo scientifico sui ceppi di riferimento che rappresentano ciascun sierotipo. Il primo studio di sierotipizzazione condotto su 75 ceppi italiani isolati dal '79 all'89, aveva evidenziato la circolazione prevalente del sierotipo 1 (ex. "A"), ma erano stati rilevati anche dei ceppi non tipizzabili con il panel di sieri allora a disposizione (sierotipi USA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, B) (Pascucci *et al.* 1990). Successivamente, studi di genotipizzazione hanno mostrato che 2 ceppi di riferimento appartenenti al sierotipo "4" in realtà non erano RA ma *Wautersiella falsenii* (Christensen e Bisgaard, 2009). L'esistenza di tale sierotipo appare pertanto messa in discussione. Sono state impiegate diverse metodiche per la caratterizzazione molecolare dei ceppi: rep-PCR (ripetitive extragenic palindromic sequence polymerase chain reaction), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction) (Yu *et al.* 2008), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del gene 16s rRNA o del gene *OmpA* (Subramaniam *et al.* 1997), analisi con endonucleasi *Hinfl* (Rimler e Nordholm, 1998), MLST (Multi Locus Sequence Typing) e PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) con enzima di restrizione *SmaI* (Yu *et al.* 2008). La caratterizzazione genetica dei ceppi di RA è uno strumento indispensabile per cercare di comprendere l'epidemiologia della malattia e suggerire delle azioni profilattiche negli allevamenti da reddito. Con il presente lavoro sono state studiate le caratteristiche genotipiche e alcune caratteristiche fenotipiche (sierotipo) di ceppi di RA circolanti in Italia, dal 2012 al 2018.

## MATERIALI E METODI

### *Collezione dei ceppi*

La collezione batterica è stata costruita grazie all'apporto di ceppi di RA isolati presso laboratori diagnostici privati o di Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Tra le centinaia di ceppi raccolti per gli studi di caratterizzazione, sono stati selezionati solo un ceppo per allevamento, o più ceppi dello stesso allevamento a patto che fossero stati isolati a distanza di almeno 12 mesi l'uno dall'altro. In totale sono stati analizzati 98 ceppi di RA isolati tra il 2012 e il 2018, da 63 tacchini da carne, 20 polli da carne, 10 anatre, 3 faraone e 2 oche. Ottantadue dei ceppi selezionati provenivano da allevamenti commerciali e 16 da allevamenti familiari.

L'isolamento è avvenuto su terreni non selettivi a base di sangue (agar sangue o columbia agar), incubati a 37 °C in condizioni di microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>) per 24 o 48 ore. Tutti gli isolati sono stati ottenuti dal cervello di soggetti deceduti in seguito a sintomatologia neurologica compatibile con riemerellosi o da lesioni anatomopatologiche riferibili a questa malattia (polisierosite e artrite).

L'identificazione è avvenuta mediante MALDI TOF MS (Bruker Daltonics), dopo opportuna implementazione del database dello strumento con ceppi di riferimento filogeneticamente vicini a RA (in particolare con *R. columbina* e *R. oropharyngis*), ed è stata successivamente confermata attraverso l'applicazione di specifici protocolli di real-time PCR (Zhang *et al.*, 2017).

### *Sierotipizzazione*

I sieri impiegati per la sierotipizzazione dei ceppi di campo sono stati prodotti su coniglio applicando protocolli consolidati disponibili in letteratura (Bisgaard M., 1982). I ceppi

di referenza appartenenti ai 21 sierotipi oggi conosciuti, utilizzati per l'immunizzazione dei conigli sieroproductori, sono stati forniti dal Prof. Christensen H., Veterinary Disease Biology, Università di Copenhagen, che qui si ringrazia.

Le colture sottoposte al test sono state ottenute su agar sangue dopo 18 ore d'incubazione a 37 °C in condizioni di microaerofilia. La sierotipizzazione è stata condotta stemperando una colonia della coltura in esame su una goccia di ciascun antisiero prodotto, preventivamente posizionata su un comune vetrino porta-oggetto, posto su fondo scuro. La formazione in pochi secondi di flocculazioni bianche, veniva interpretata come fortemente positiva per quel sierotipo. Reazioni più tardive o senza una netta agglutinazione, venivano annotate come debolmente positive. Un'ansata della coltura in esame veniva stemperata anche su una goccia di soluzione fisiologica per identificare eventuali ceppi autoagglutinanti.

#### *Caratterizzazione genetica*

I ceppi isolati nell'ambito della ricerca sono stati caratterizzati geneticamente attraverso Multilocus Sequence Typing (MLST) e Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

L'MLST è stato eseguito secondo il protocollo descritto da Zhou *et al.* (2015), che prevede l'amplificazione dei seguenti geni: *mdh*, *gluD*, *rpoB*, *dnaB*, *gyrA*, *groEL* e *gpi*. Le sequenze ottenute sono state analizzate ed inserite nel *Riemerella antipestifer* sequence/profile database (<http://pubmlst.org/ranatipestifer/>) a cura del Dr. Di Zhou. L'elaborazione grafica è stata ottenuta impiegando il software Bionumericis, versione 7.6 (Applied Maths). I STs sono stati analizzati attraverso il software Phyloviz versione 2.0 (<http://www.phyloviz.net/>) che, applicando l'algoritmo goeBURST, è in grado di raggrupparli in clonal complex sulla base della singola variazione di locus.

La PFGE è stata eseguita secondo il protocollo pubblicato da Yu *et al.* (2008). La similarità tra i ceppi ottenuti è stata studiata impiegando il software Bionumericis versione 7.6 (Applied Maths). Tale software permette di costruire un dendrogramma sulla base delle similarità tra i pulsotipi, che viene calcolata utilizzando il Dice similarity coefficient. Come algoritmo di clustering è stato utilizzato l'UPGMA con una tolleranza dell'1,5% e ottimizzazione dell'1%.

## **RISULTATI**

### *Sierotipizzazione*

L'89,7 % dei ceppi analizzati (88/98) apparteneva al sierotipo "1", il 3% (3/98) al sierotipo "18", 1 ceppo isolato da polli di un allevamento rurale apparteneva al sierotipo "13" mentre 6 ceppi hanno dato delle reazioni dubbie o assenti o hanno reagito con più di un siero. Questi ceppi saranno ritestati attraverso il metodo della sierotipizzazione lenta. Il sierotipo "1" era presente in tutti gli anni in cui si è svolto l'arruolamento dei ceppi, e in tutte le specie animali incluse nello studio, indipendentemente dal fatto che si trattasse di isolati da allevamenti commerciali o da allevamenti rurali. I tre ceppi appartenenti al sierotipo 18 erano tutti stati isolati in allevamenti commerciali (2 da tacchini da carne e uno da faraone) nei soli anni 2012 e 2013.

### *MLST*

L'analisi genetica dei ceppi attraverso MLST ha messo in evidenza che i ceppi italiani appartenevano tutti a 13 sequence type (STs) mai descritti prima, e chiaramente distinti dai ceppi isolati in Cina (figura 1). Solo 6 ceppi sono risultati legati geneticamente a

ceppi cinesi. Tra questi ultimi, 2 isolati da tacchini da carne nel 2012 appartenevano al sierotipo “18”; 2 isolati da allevamenti commerciali di faraone appartenevano al sierotipo “18”, un isolato da pollo rurale apparteneva al sierotipo “13” e uno isolato da oca era risultato non sierotipizzabile. Il numero di ceppi appartenente a ciascun sequence type con assegnata la specie d’isolamento è riassunto in tabella 1.

L’80,5% dei ceppi isolati da allevamenti industriali e il 43,75% dei ceppi isolati da allevamenti rurali appartenevano al solo ST 46. Nei ceppi isolati da anatidi (anatre e oche) il ST 52 si è dimostrato prevalente (50%), mentre il ST 46 è stato individuato nel 25% dei ceppi isolati in queste specie. Tutti i ceppi ST 46 appartenevano al sierotipo 1, tranne 3 ai quali non si è riusciti ad assegnare alcun sierotipo attraverso la sierotipizzazione rapida.

Tra i 9 ceppi del 2012 isolati da allevamenti commerciali, nessuno apparteneva al ST 46, mentre nel 2013 tale ST è stato identificato in 4 dei 9 ceppi selezionati per quest’anno, sempre da allevamenti commerciali di tacchini da carne. Dal 2014 al 2018 il ST 46 è stato rilevato in una percentuale di ceppi che variava dal 96 al 100% dei ceppi analizzati in ciascun anno.

L’analisi dei ST con software dedicati, ha portato ad individuare 4 clonal complex formati da un minimo di 2 a un massimo di 3 ST. Quattro STs non sono stati associati a nessun clonal complex (singleton), e tra questi compare anche il ST epidemico 46.

### *PFGE*

Ponendo arbitrariamente un convenzionale cut-off dell’80 % di similarità tra i pulsotipi ottenuti, si è potuto individuare 11 diversi cluster. I cluster “I”, “II”, e “III” comprendono in tutto 9 ceppi di cui 6 appartenenti a sierotipi diversi dal sierotipo “1”, isolati tra il 2012 e il 2013 e uno isolato nel 2017 da un’oca. Nessuno di questi ceppi apparteneva al ST 46.

Il cluster “IV” è il più ampio, comprendendo al suo interno 67 ceppi, di cui 64 appartenenti al sierotipo “1” (3 non tipizzabili) e 66 ceppi al ST 46 (1 ceppo era ST 53). Nei cluster “V”, “VI” e “VII” e “IX” si trovano 7 ceppi: 4 isolati da pollo e 3 da tacchino, appartenenti tutti al sierotipo “1” e al ST 46.

Il cluster “VIII” è il secondo più ampio in termini di numerosità, comprendendo al suo interno 8 ceppi appartenenti tutti al sierotipo “1”, mentre 7/8 sono risultati ST 52 e 1 ST 54. Sei di questi ceppi erano stati isolati da anatre (2 di allevamenti commerciali e 4 da allevamenti rurali), uno da un’oca rurale e uno da un pollo rurale.

Nel cluster “X” si collocano 6 ceppi del sierotipo “1”, isolati da allevamenti commerciali di polli e tacchini tra il 2012 e il 2013, di cui 5 appartenenti al ST 50 e 1 al ST 49.

Il cluster “XI” è rappresentato da un unico ceppo isolato da un’anatra rurale, di sierotipo non determinabile e appartenente al ST 56.

### **DISCUSSIONE**

I risultati ottenuti dimostrano come i ceppi isolati in Italia siano molto diversi da quelli di origine asiatica, confermando una sostanziale “identità geografica”.

I dati di sierotipizzazione mostrano una certa evoluzione temporale dei ceppi di RA circolati negli allevamenti italiani commerciali di tacchini da carne. Infatti, nel 2012 in questi allevamenti è stata rilevata la circolazione sia del sierotipo “1” che del sierotipo “18”, anche se l’analisi ha riguardato un numero esiguo di ceppi. È interessante osservare come il sierotipo “18” circolasse anche in allevamenti commerciali di faraone nel 2013.

Dal 2014 in poi, negli allevamenti commerciali di polli e tacchini è stata rilevata la circolazione solo di ceppi appartenenti al sierotipo “1”. Questa evoluzione temporale è confermata anche dai risultati dell’MLST e PFGE. Infatti, nel 2012, gli isolati di RA da allevamenti commerciali di polli e tacchini appartenevano a STs diversi rispetto al ST 46, che dal 2014 al 2018 è risultato essere epidemico in queste realtà produttive.

Per quanto riguarda la PFGE, è interessante osservare come quasi il 70 % dei ceppi analizzati sia collocato in un unico cluster (IV) e che tali ceppi appartengano tutti al sierotipo “1” e al ST 46. Tale metodica, che si basa sulla caratterizzazione dell’intero genoma, mostra che 60/67 ceppi hanno un’omologia genetica del 100%, risultando pertanto dei cloni, distribuiti primariamente in allevamenti di tacchini e polli da carne e, sporadicamente, in allevamenti di faraone e anatre. In quest’ultima specie, che è considerata l’ospite più importante nel continente asiatico, la maggior parte dei ceppi inclusi nello studio, seppure di sierotipo “1”, appartenevano a STs diversi, rappresentati dal ST 52, indipendentemente che i ceppi provenissero da allevamenti rurali o commerciali. Come il ST 46 abbia potuto comparire pressoché simultaneamente in allevamenti di tacchini dislocati in province e regioni diverse del nord Italia, resta ancora da capire.

Mentre nel tacchino la riemerlosi è una patologia da considerarsi endemica, nel pollo si presenta solo sporadicamente. Viste le stringenti misure di biosicurezza che caratterizzano gli allevamenti avicoli industriali, il passaggio dal tacchino al pollo e viceversa potrebbe forse essere giustificata da una sporadica promiscuità di personale tra le due tipologie di allevamento che si può verificare ad esempio durante le operazioni di vaccinazione (tacchino) o di carico durante il ciclo produttivo (es. sfolto delle femmine negli allevamenti di broiler).

Dai risultati ottenuti appare chiaro che eventuali strategie vaccinali di contenimento della riemerlosi in allevamenti commerciali italiani di tacchini devono prevedere l’adozione di presidi immunizzanti allestiti a partire sicuramente da ceppi appartenenti al sierotipo “1” ed eventualmente “18”, vista la loro circolazione nel nostro paese, anche se in anni diversi. Dato che l’immunità verso batteri Gram-negativi viene conferita non solo dalla componente lipopolisaccaridica che è strettamente legata alla definizione di “sierotipo”, ma anche da altre componenti della membrana cellulare e prodotti batterici noti (come la proteina Omp) e non, sarebbe opportuno includere in eventuali vaccini inattivati, ceppi geneticamente distanti tra loro, che hanno però causato la malattia in allevamenti commerciali. Tra questi si segnalano i ceppi appartenenti ai ST 47, 48, 49 (o 50) e 51 che, oltretutto, si sono collocati in cluster diversi tra loro. Per quanto riguarda invece l’immunizzazione di anatidi, i STs d’interesse sono soprattutto il 52 e il 54, oltre al 46.

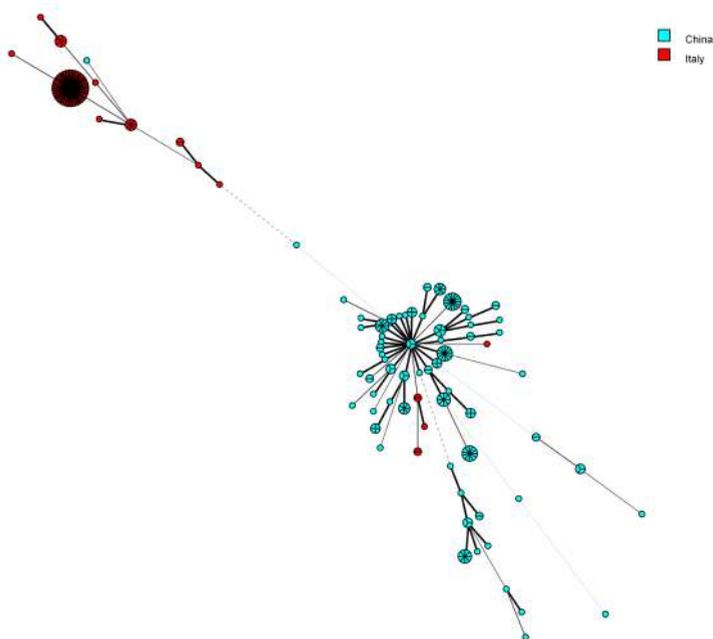
## **CONCLUSIONI**

La riemerlosi è una malattia endemica nel nostro paese che, in alcuni anni (soprattutto 2014 e 2015), si è presentata con picchi epidemici di difficile spiegazione. Il presente studio di caratterizzazione degli isolati ha dimostrato che un nuovo ceppo ha fatto la sua comparsa nel 2013 negli allevamenti da reddito di polli e tacchini ed ha aumentato la sua diffusione sino a divenire di fatto il ceppo clonale prevalente. Tale ceppo appartiene al sierotipo “1” e al ST 46. Come questo ceppo sia comparso improvvisamente ma pressoché simultaneamente in allevamenti di tacchini e polli da carne dislocati in aree geografiche anche diverse tra loro resta ancora da chiarire. La netta prevalenza di un ceppo clonale negli allevamenti da reddito suggerisce misure di profilassi indiretta mirate.

**Tabella 1.** Risultati dell'MLST con il numero di ceppi appartenenti a ciascun nuovo sequence type (ST) individuato nel corso del presente studio, e differenziato per specie d'isolamento. T: tacchino; P: pollo; A: anatra; F: faraona; O: oca.

<i>id</i>	<i>country</i>	<i>dnaB</i>	<i>groEL</i>	<i>gyrA</i>	<i>mdh</i>	<i>gluD</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoB</i>	<i>ST</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>O</i>	<i>n° ceppi</i>
<b>188</b>	Italy	3	29	7	5	29	13	18	<b>46</b>	56	13	3	1	0	73
<b>189</b>	Italy	2	3	1	1	1	10	3	<b>47</b>	2	0	0	0	0	2
<b>190</b>	Italy	3	29	8	26	29	12	18	<b>48</b>	1	0	0	0	0	1
<b>191</b>	Italy	5	5	8	5	29	6	18	<b>49</b>	1	0	0	0	0	1
<b>192</b>	Italy	5	6	8	5	29	6	18	<b>50</b>	1	4	0	0	0	5
<b>193</b>	Italy	3	29	8	6	29	12	18	<b>51</b>	2	0	0	0	0	2
<b>194</b>	Italy	3	29	9	5	29	30	18	<b>52</b>	0	1	5	0	1	7
<b>195</b>	Italy	3	29	8	6	29	6	18	<b>53</b>	0	1	0	0	0	1
<b>196</b>	Italy	3	29	10	5	29	30	18	<b>54</b>	0	0	1	0	0	1
<b>197</b>	Italy	2	1	1	7	1	10	22	<b>55</b>	0	1	0	0	0	1
<b>198</b>	Italy	5	6	9	5	29	30	18	<b>56</b>	0	0	1	0	0	1
<b>204</b>	Italy	2	7	12	1	1	10	3	<b>79</b>	0	0	0	2	0	2
<b>203</b>	Italy	2	6	1	1	1	10	3	<b>82</b>	0	0	0	0	1	1

**Figura 1.** Distribuzione dei ST di ceppi italiani e cinesi caratterizzati tramite MLST.



## BIBLIOGRAFIA

1. Christensen H., Bisgaard M. (2010). Phylogenetic relationships of *Riemerella anatipestifer* serovars and related taxa and an evaluation of specific PCR tests reported for *R. anatipestifer*. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1612-1619.
2. Giovannetti L., Pascucci S. (1983). Evoluzione dell'infezione da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino e nel pollo da carne. *La Clinica Veterinaria*, 106, 42-44.
3. Pascucci S., Pacchioni G., Tagliabue S., Giovanetti L., (1981). Infezioni da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino. *La Clinica Veterinaria*, 104, 10-11, 352-354
4. Pascucci S., Giovannetti L., Massi P. (1990). Caratteristiche di ceppi di *Pasteurella anatipestifer* isolati in Italia. *Zootecnica International*, giugno 1990, 50-53.
5. Riemer O. (1904). Short communication about an exudative septicaemia observed in geese and its causative agent. *Zentralblatt Bakteriologie*, 37: 641-648
6. Rimler R.B., Nordholm G.E. (1998). DNA fingerprinting of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Diseases*, 42: 101-105.
7. Rubbenstroth D., Ryll, M., Hotzel H., Christensen H., Knobloch J. K. M., Rautenschlein S., Bisgaard M. (2013). Description of *Riemerella columbipharyngis* sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica), and emended descriptions of the genus *Riemerella*, *Riemerella anatipestifer* and *Riemerella columbina*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1), 280-287.
8. Subramaniam S., Chua K.L., Tan H.M., Loh H., Kuhnert P., Frey J. (1997). Phylogenetic position of *Riemerella anatipestifer* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 562-565.
9. Vancanneyt M., Vandamme P., Segers P., Torck U., Coopman R., Kersters K., Hinz K. H. (1999). *Riemerella columbina* sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 289-295.
10. Yu C.Y., Liu Y.W., Chou S.J., Chao M.R., Weng B.C., Tsay J.G., Chiu C.H., Wu C.C., Lin T.L., Chang C.C., Chu C. (2008). Genomic diversity and molecular differentiation of *Riemerella anatipestifer* associated with eight outbreaks in five farms. *Avian Pathology*, 37: 273-279.
11. Zhang Q., Wan C., Li C., Bai X., Liu M., Liu S., Zhang Y. (2017). Evaluation of a quantitative real-time PCR for rapid detection of *Riemerella Anatipestifer* infection in birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(12), 2057-2062.
12. Zhou, B.F., Chao, M., Yang, X.F. and Zhou, D. (2015) Multilocus Sequence Typing of Guangdong isolates of *Riemerella anatipestifer* from Ducks in China. *Open Journal of Animal Sciences*, 5, 332-342.



# INCIDENZA DELLA MORTALITA' EMBRIONALE IN UOVA DA COVA SOTTOPOSTE A VACCINAZIONE "IN OVO"

Bongiorno V.<sup>1</sup>, Castellina C.<sup>2</sup>, Ferrazzi V.<sup>3</sup>, Grilli G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, via dell'Università 6, 26900 Lodi.*

<sup>2</sup> *Aglietto Natura s.r.l., viale Roma 9, 13041 Bianzè (Vc).*

<sup>3</sup> *Azienda Sanitaria Locale di Vercelli, c.so M. Abbiate 21, 13100 Vercelli.*

## Summary

In this research, the incidence of embryonic mortality in hatching eggs vaccinated at 18 days of embryonic life was assessed. More than 10,000 hatching eggs belonging to 3 hybrids for the production of broiler chicks and one for the production of egg chicks were examined; the examination period covered 12 consecutive hatchings; half of the eggs had been vaccinated against Marek's disease, and half had not. Embryonic mortality from the day of vaccination to hatching (18) affected, on average, 6.6% of vaccinated eggs against 7.6 % of unvaccinated eggs with different incidences between hybrids. The abnormal eggs, i.e. contaminated, broken on transfer, malpositioned, pecked and malformed, affected respectively 0.036% in the vaccinated groups and 0.052% in the unvaccinated eggs. There were no significant differences in microbial contamination (bacteria and fungi).

From this work, we can see that in ovo vaccination at 18 days of embryonic life, if well conducted, does not cause damage to the embryo and the hatching yield is comparable.

## INTRODUZIONE

Le produzioni avicole rivestono una quota importante nell'approvvigionamento di alimenti a livello mondiale, specialmente per quanto concerne la produzione di carne di pollo (122,5 milioni di tonnellate nel 2018) e di uova (74 milioni di tonnellate nel 2018). Per rispondere prontamente all'incremento dei consumi occorre ottimizzare gli indici produttivi a sostegno di migliori performance degli animali; è fondamentale un approccio integrato dove ogni fattore non venga considerato singolarmente in quanto opera in sinergia o antagonismo con gli altri. Gli interventi da attuare per migliorare le performance produttive riguardano prima di tutto il management degli animali e la loro nutrizione; se non ottimali, non favoriranno la manifestazione del potenziale genetico dei soggetti, punto altrettanto fondamentale e già ampiamente sfruttato nel comparto avicolo (Saeed *et al.*, 2019). Indispensabile è l'attuazione contemporanea di piani di biosicurezza interni ed esterni, per prevenire l'ingresso e la diffusione di patologie in allevamento. Tra i vari momenti produttivi della filiera, l'incubazione delle uova è una fase molto delicata alla quale va dedicata particolare attenzione al fine di ottenere buone percentuali di schiusa e pulcini sani e vitali (Tullett, 2009). Diversi sono i fattori che possono influire sul successo in incubatoio e dipendono sia dall'allevamento di provenienza delle uova, che dal management prima e durante l'incubazione stessa. Negli ultimi anni si sta diffondendo la pratica della vaccinazione in ovo che permette un'immunizzazione

precoce del pulcino e una standardizzazione della vaccinazione con minor uso di manodopera. Le apparecchiature utilizzate però, se non perfettamente regolate, così come la qualità dell'uovo da vaccinare, possono peggiorare le performance di schiusa causando gravi danni all'embrione: Il presente lavoro è stato sviluppato al fine di valutare l'effetto della vaccinazione in ovo sulla schiusa delle uova e sulla mortalità embrionale.

## **MATERIALI E METODI**

La presente ricerca è stata condotta presso un incubatoio piemontese che ha una capacità di schiusa di 200.000/300.000 pulcini a settimana. Le uova provengono da allevamenti di riproduttori di diversi ibridi da carne e da uova, in parte di proprietà dell'azienda e in parte di terzi. La struttura dell'incubatoio presenta una sala stoccaggio, in cui le uova sostano prima di essere incubate, a temperatura e umidità controllate. Sono qui sottoposte a un'attenta selezione da parte del personale: vengono eliminate eventuali uova rotte, sporche o con anomalie e difetti di forma e dimensione; tutte le uova stoccate subiscono un processo di disinfezione. Sono inoltre presenti due sale d'incubazione, un laboratorio, adibito alla detenzione dei vaccini e alla preparazione delle dosi; la sala vaccinazione *in ovo*, dove giungono le uova da sottoporre a questa pratica durante il trasferimento. In questa sala è presente la macchina per la vaccinazione in ovo Embrex Inovoject, questa apparecchiatura è in grado di vaccinare circa 40.000 uova ogni ora ed è presente un doppio sistema di controllo che permette di eliminare le uova non fertili. Successivamente le uova passano in Sala di schiusa, in cui macchine apposite conterranno le uova per gli ultimi tre giorni, periodo entro il quale lo sviluppo embrionale sarà completato. Per la sperimentazione sono state controllate 12 schiuse omogenee per numerosità, in cui erano presenti uova vaccinate e no, deposte da 3 ibridi da carne diversi denominati A, B e C ed un ibrido da uova C. Le uova non schiuse e valutate per ogni schiusa e per ogni ibrido, provenivano direttamente da 3 cestelli da 150 uova vaccinate, denominate "vax" e altrettante non vaccinate, denominate "no vax"; tutte le uova scartate sono state aperte e catalogate per età della mortalità embrionale e per eventuali altre alterazioni visibili (uova rotte, contaminate, con embrione mal posizionato o deforme). A campione, le uova scartate di entrambi i gruppi sono state sottoposte ad analisi microbiologica (batteri e miceti) secondo le metodiche tradizionali.

Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il programma SPSS.

## **RISULTATI**

In totale sono state singolarmente analizzate oltre 10.000 uova provenienti da 4 ibridi diversi di cui la metà sottoposte a vaccinazione. La valutazione della mortalità embrionale è stata considerata anche nei periodi precedenti la vaccinazione, sulle uova scartate alla speratura, come evidenziato in tabella I; in questa tabella vengono riportate le medie delle mortalità in % degli ibridi; ai fini della presente ricerca viene considerata importante quella 19-21 giorni.

**Tabella I:** dati riassuntivi in % tra i gruppi di uova vaccinate o no, dati medi degli ibridi testati

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	0,916667	0,277778	0,638889	7,638889
vax	0,121212	0,30303	0,323232	6,646465

Nello specifico, le percentuali riportate per ogni singolo ibrido sono evidenziate nelle Tabelle II, III, IV e V.

**Tabella II:** mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido A

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	0,14	0,44	0,81	12,44
vax	0,07	0,59	0,29	11,03

**Tabella III:** mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido B

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	1,33	0,44	0,44	6
vax	0,06	0,06	0,06	2,22

**Tabella IV:** mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido C

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	4	0,22	1,11	3,55
vax	0,44	0,22	0,88	5,55

**Tabella V:** mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido D

Mortalità embionale	1-3 day	4-7 day	8-17 day	18-21 day
no vax	0	0	0,66	3,77
vax	0	0,22	0,10	4,22

Nessuna differenza tra le 2 tipologie di uova di ogni ibrido ha raggiunto significatività statistica. Alla schiusa sono state segnalate anche le uova anomale, cioè contaminate, rotte al trasferimento, malposizionate, beccate e malformate, che hanno

interessato rispettivamente lo 0,036% nei gruppi “vax” e lo 0,052% nelle uova “no vax”; le differenze sono minime e non significative, nella tabella VI vengono riportate le % specifiche di ogni voce.

**Tabella VI:** percentuali di uova anomale riscontrate nei 2 gruppi di uova, media degli ibridi

	Vax	no vax
contaminate	23	31
rotte al trasferimento	8	11
malposizionate	19	28
embrione deforme	15	13
beccate	35	17

Le uova contaminate sono state sottoposte ad Wesami microbiologici e non sono state ritrovate differenze statisticamente significative, le specie batteriche ritrovate sono state *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Proteus vulgaris* tra i gram negativi e *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylo-sus*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* tra i gram positivi. Tra i miceti sono stati ritrovati *Absidia spp.*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium spp.*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*

## DISCUSSIONE

La produzione di pollame è, ormai da anni, un’attività praticata su scala industriale; quindi, per tenere il passo dell’incremento di domanda mondiale di carne avicola, ormai superiore a quella suina, è necessaria l’adozione di tecnologie efficienti sotto il profilo delle pratiche di gestione, selezione genetica, nutrizione e prevenzione delle malattie. Tra queste, la gestione igienico sanitaria e tecnica dell’incubazione è fondamentale per avere una qualità del pulcino ottimale tale da garantire da subito un buon accasamento in allevamento dello stesso. Oltre ai vari parametri da controllare quali sanità ed età dei riproduttori, gestione dell’uovo in allevamento e in incubatoio, vaccinazione del pulcino neonato ecc., negli ultimi anni si è aggiunta anche la possibilità di vaccinare *in ovo*.

Il nostro lavoro voleva valutare principalmente l’impatto di questa pratica sulla mortalità embrionale, prendendo in considerazione varie linee genetiche tra loro. I calcoli sono stati effettuati sul totale delle uova incubate. Tendenzialmente la mortalità embrionale media di ibridi commerciali di polli da carne è tra il 10% e il 16% con variazioni in base all’età dei riproduttori: è minima nelle uova deposte dai giovani riproduttori entro le 45 settimane di età (8% di mortalità embrionale) e massima nei riproduttori di oltre 55/60 settimane di età (fino al 23% di mortalità embrionale) (Peñuela e Hernandez, 2018). In linea generale, considerando solo le morti embrionali, una buona percentuale è rappresentata da soggetti ai primi stadi di sviluppo e da embrioni tra i 18 e i 21 giorni. Questi due periodi, infatti,

sono i più critici. Nei primi giorni si ha una ripresa dello sviluppo embrionale dopo il periodo di conservazione; nell'ultima fase l'embrione si prepara a bucare dapprima le membrane interne e successivamente il guscio, fatto che implica un notevole sforzo e impegno muscolare (Tullett, 2009; Peñuela e Hernandez, 2017). La variazione di mortalità tra i gruppi, dal momento dell'incubazione al momento della vaccinazione (Tab. I) è da considerarsi del tutto casuale in quanto non vi sono variabili che agiscono in maniera differente tra gruppo "vax" e "no vax". La fase di mortalità tra la vaccinazione in ovo e la schiusa (18 e 21 giorni) va analizzata attentamente, in quanto unico scenario in cui si può manifestare un'influenza diretta della pratica vaccinale sulla schiusa. Dai dati ottenuti non emergono differenze tra "vax" e "no vax". Questo dimostra l'efficacia e la sicurezza del metodo che pur essendo all'apparenza "cruento" non influenza negativamente la schiusa offrendo unicamente vantaggi (Sokale et al., 2016). Tra i principali troviamo: copertura anticorpale precoce senza interferenza con l'immunità materna; maggiore velocità nella gestione della profilassi vaccinale; riduzione dei costi di manodopera; minor rischio per gli operatori; maggiore precisione ed efficienza nello svolgimento delle attività, somministrazione di più vaccini, che con questo metodo può avvenire in un solo passaggio (Peebles, 2018; Saeed et al., 2019). Diversi studi dimostrano, inoltre, differenze in positivo su parametri valutati post schiusa, tra cui: peso corporeo, indice di conversione alimentare, incremento ponderale, mortalità ridotta (Sokale et al., 2017). Per quanto riguarda i singoli ibridi (tabb. II, III, IV e V) non emergono differenze tra le uova "vax" e "no vax" mentre sono evidenti delle differenze tra ibridi. L'ibrido A, rappresentato nella tab. II, mostra una mortalità dell'ultimo periodo mediamente più alta rispetto agli altri ibridi probabilmente legata all'età dei riproduttori che erano nelle ultime settimane di deposizione. E' noto, infatti, che le uova deposte da riproduttori verso fine carriera sono caratterizzate da un aumento della mortalità embrionale (Peñuela e Hernandez, 2017), legata soprattutto alla maggiore perdita di umidità delle uova (McDaniel et al., 1979). Nella tab. III viene invece considerato un ibrido commerciale da carne ad accrescimento rapido. Visivamente sono più evidenti le differenze tra uova vaccinate e no, sebbene statisticamente non siano significative. La Tab. IV considera un altro ibrido da carne ad accrescimento rapido. E' subito evidente quanto, in questo caso, sia maggiormente incidente la percentuale di mortalità delle uova "vax" senza però raggiungere una significatività statistica. La tab. V riporta l'ultima informazione sul singolo ibrido che è qui a produzione di uova a guscio chiaro; anche in questo caso la mortalità nelle uova "vax" è leggermente superiore senza raggiungere significatività statistica. Per quanto riguarda le uova considerate anomale, le percentuali assolute sono sicuramente basse e da considerarsi nella norma anche se alcuni parametri inferiori nelle uova "vax" (malposizionate, rotte al trasferimento) fanno pensare ad una maggiore attenzione degli operatori nel selezionare le uova destinate alla vaccinazione. Per quanto riguarda le uova beccate o "pipped" invece la percentuale nelle uova "vax" è più elevata. Le cause possono essere diverse ma nel nostro caso si può ipotizzare che in queste uova l'introduzione dell'ago possa avere in qualche modo toccato, e quindi lesionato, i muscoli del collo che sono quelli deputati a sopportare lo sforzo della rottura del guscio alla nascita. Per quanto riguarda le uova contaminate, sempre percentualmente molto basse, in entrambi i gruppi, come potevamo ipotizzare, sono presenti gli stessi batteri

e miceti. Non è stata riscontrata la presenza di batteri considerati patogeni, tra cui *Salmonella* spp., *E. coli* e *Staphylococcus aureus* che vengono segnalati dalla maggior parte degli Autori come un pericolo (Gehan, 2009). Una nota va fatta per la presenza di *Enterococcus faecalis* che fa parte della normale flora batterica della gallina, ma che potenzialmente può dare patologia al pulcino in quanto ritenuto responsabile di artropatia amiloide e di altre patologie (Fertner et al., 2011; Blanco et al., 2017)).

Dai dati di contaminazione micotica delle uova si può affermare che la situazione riscontrata è positiva dal momento in cui non si è mai rilevata la presenza di *Aspergillus fumigatus*. Questa specie fungina, infatti, viene considerata molto pericolosa per le sue caratteristiche di infettività e patogenicità sugli embrioni e sui pulcini neonati (Arné et al., 2011; Munir et al., 2017). I miceti maggiormente presenti sono *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp., ovvero microrganismi la cui presenza è tipica del bioaerosol (Comi, 2009). Diversi autori confermano l'identificazione degli stessi generi fungini in ricerche condotte negli incubatoi avicoli di altri paesi (Eckman e Morgan-Jones, 1979).

## CONCLUSIONI

L'avicoltura è un comparto produttivo dalle elevate potenzialità. Come settore in crescita trae beneficio da innovazioni tecnologiche che ne velocizzano i processi. Devono essere soddisfatte le richieste del consumatore e le esigenze di un mercato in continua espansione. D'altra parte, sempre maggiori sono le pressioni in merito alla riduzione dell'uso di antibiotici, con impatto rilevante sull'opinione pubblica (Luhmann e Theuvsen, 2017; Mehdi et al., 2018). La profilassi vaccinale, di per sé tecnica preventiva, ha offerto e continua a offrire un contributo importante per il contenimento delle patologie. La vaccinazione in ovo si sta diffondendo e viene utilizzata in un numero crescente di incubatoi anche in Europa. Uno dei principali punti di forza che stimola l'uso di questo sistema è il numero crescente di vaccini adatti al metodo; tra questi sono compresi i moderni vaccini vettoriali che offrono una protezione precoce contro diverse malattie in contemporanea e vaccini con immunocomplessi che possono essere somministrati in presenza di anticorpi materni (Peebles, 2018; Saeed et al., 2019). La vaccinazione individuale di embrioni durante il trasferimento dall'incubatrice alla schiusa è molto meno laboriosa rispetto alla vaccinazione sottocutanea o intramuscolare di pulcini di un giorno, in quanto completamente robotizzata. Va ricordato però che la vaccinazione in ovo non è un evento, ma la fase di un processo. Considerare attentamente i fattori interni all'incubatoio è fondamentale, perché anche se non direttamente collegati all'intervento vaccinale possono influenzarne l'esito. Dall'esperienza qui riportata, si evince che un impianto gestito correttamente, come nel nostro caso, non comporti nessun effetto negativo sulla mortalità embrionale, in accordo con quanto dimostrato recentemente anche da Sokale et al., (2017). Nonostante ciò, ci possono essere dei margini di miglioramento: una maggiore attenzione da parte degli operatori permetterebbe una riduzione del numero di uova mal posizionate (capovolte); inoltre, una taratura più precisa della macchina sulla base delle dimensioni delle uova deposte dai diversi riproduttori, sarebbe utile per ridurre le possibili lesioni provocate dall'inserimento degli aghi nelle uova.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arné P, Thierry S, Wang, D, Deville M, Leloc'h G, Desoutter A, Femenia F, Nieguitisila A, Huang W, Chermette R, Guillot J, (2011). *Aspergillus fumigatus* in Poultry. International Journal of Microbiology, doi:10.1155/2011/74635.
2. Blanco, A.E., Barz, M., Caverio, D., Icken, W., Sharifi, A.R., Voss, M., Preisinger, R. & Buxadé, C. (2017). Chicken embryo lethality assay for determining the lethal dose and virulence of *Enterococcus faecalis*. Avian Pathology, 46, 548–555.
3. Comi G., (2009). Microbiologia dell'aria, Modena Fiere, Convegno Sicura.
4. Eckman M. K, Morgan-Jones G, (1979). Fungus Species Isolated from Commercial Hatcheries in Alabama. Avian Diseases No. 1 (Jan. - Mar.), 23: 204-208.
5. Fertner ME, Olsen RH, Bisgaard M, Christensen H. (2011). Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. Acta Vet Scand. 53(1): 56
6. Gehan Z.M. (2009). A new approach to evaluate the hygienic condition of commercial hatcheries. Int. J. of Poultry Science, 8:1047-1051.
7. Luhmann H, Theuvsen L. (2017). Analyzing consumer preferences for CSR-activities by German poultry producers with adaptive conjoint analysis. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2: 349–359.
8. McDaniel GR, Roland DA, Coleman MA. (1979). The effect of eggshell quality on hatchability and embryonic mortality. Poult Sci, 58:10-13.
9. Mehdi Y, Létourneau-Montminy M, Gaucher M, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Brar SK, Côté C, Ramirez AA, Godbout S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives. Anim Nutr, 4: 170-178.
10. Munir MT, Rehman ZU, Shah., Umar S, (2017). Interactions of *Aspergillus fumigatus* with the respiratory system in poultry, World's Poultry Science Journal, 3(2): 321-336.
11. Peebles ED. (2018) In ovo applications in poultry: a review. Poult Sci, 97: 2322–2338.
12. Peñuela AS, Hernandez AV. (2018). Characterization of embryonic mortality in broilers. Rev MVZ Cordoba, 23: 6500-6513.
13. Saeed M, Babazadeh D, Naveed M, Alagawany M, El-Hack M, A-Arain M, Chaoa S, Dhama K, E-Abd, Karthik K, S-Elnesrk S, Sachan S, Tiwari R. (2019). In ovo delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in poultry: current knowledge. J Sci Food Agric, 99: 3727–3739.
14. Sokale AO, Zhai W, Pote LM, Williams CJ, Peebles ED. (2017). Effects of coccidiosis vaccination administered by in ovo injection on Ross 708 broiler performance through 14 days of post-hatch age. Poult Sci, 96: 2546–2551.
15. Tullett S. (2009) ROSS TECH, Controlli in incubatoio. Aviagen



# INDAGINE SU STAPHYLOCOCCI METICILLINO-RESISTENTI ED ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI ESBL IN UN ALLEVAMENTO INTENSIVO DI BROILER DEL NORD-OVEST ITALIA

Bonvegna M.<sup>1</sup>, Dellepiane L.<sup>1</sup>, Stella M.C.<sup>1</sup>, Tomassone L.<sup>1</sup>, Nebbia P.<sup>1</sup>, Piovano F.<sup>2</sup>, Mannelli A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Largo P. Braccini 2, 10095, Grugliasco (Torino), Italia;

<sup>2</sup>Servizio veterinario ASL Alessandria, 15121, Via Venezia 6, Alessandria, Italia;

## Summary

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *E. coli* (ESBL-*E. coli*) are a threat to public health. Apart from methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), also MRS are gaining attention, especially for the potentiality of the transmission of the *mecA* gene to more pathogenic species, such as *S. aureus*. In this study we investigated MRS and ESBL-*E. coli* colonisation in broilers (90 animals) and farm environment (18 samples) from a North-western Italian farm, throughout the production cycle (time 0, 5 and 27 days). Phenotypic results on MRS in animals indicated a prevalence ranging from 0% at time zero, to 73.3% at 27 days. For ESBL-*E. coli*, the highest prevalence was registered at 5 days (23.3%), and, decreased at 27 days (3.3%). ESBL-*E. coli* in the environment were recovered only in one sample at 5 days, while MRS were always detected (67% at time 0, 100% at 5 and 27 days). All the MRS positive samples carried *mecA* gene; *Staphylococcus sciuri* was the most common bacteria identified. No MRSA was detected. ESBL-*E. coli* carried *bla*<sub>CTX-M</sub> gene in 3 out of 8 positive animals' samples and in one environmental sample. The recovery of MRS and ESBL-*E. coli* in broilers and farm environment may be relevant especially for farm workers, that can be at risk of acquiring these bacteria from strict contact with animals and farm environment.

## INTRODUZIONE

L'antimicrobico-resistenza (AMR) è ad oggi uno dei più importanti problemi sanitari, per l'uomo, l'ambiente e gli animali, soprattutto d'allevamento [1]. Secondo la letteratura, i broiler italiani presentano un'alta percentuale di colonizzazione da *Escherichia coli* produttori di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL-*E. coli*) (86%) [2]. Ad oggi pochi studi hanno invece documentato la presenza di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) nei polli [3,4,5], e ancor meno sono le ricerche che hanno indagato la presenza di altri staphylococchi meticillino-resistenti (MRS). Fra questi, gli staphylococchi coagulasi negativi (CoNS) sono considerati normali commensali delle narici e della cute degli avicoli [6,7], ma stanno gradualmente diventando sempre più importanti dal punto di vista clinico, nella patologia aviaria e umana. Oltretutto, rappresentano un problema di salute pubblica poiché possono essere reservoir del gene *mecA* (responsabile della meticillino-resistenza), per specie più patogene, quali *S. aureus* [8,9]. Obiettivo di questo studio è quello di indagare la presenza di MRS e ESBL-*E. coli* in broiler sani e nel loro ambiente, in un allevamento del Sud-est piemontese, in momenti diversi del ciclo produttivo (tempo 0, 5, e 27 giorni).

## MATERIALI E METODI

I campioni sono stati prelevati in un allevamento intensivo di broiler nel sud-est del Piemonte, tra gennaio e marzo 2019. Sono stati effettuati in totale tre campionamenti a 0, 5 e 27 giorni del ciclo d'ingrasso. Ogni campionamento prevedeva il recupero di 30 tamponi fecali animali per ESBL-*E. coli*, 30 cutanei per MRS, e 3 tamponi ambientali per i rispettivi due gruppi batterici. In totale sono stati campionati 90 animali, sia per MRS che per ESBL-*E. coli*, mentre sono stati prelevati 9 campioni ambientali per MRS e 9 campioni per ESBL-*E. coli*. Le analisi di laboratorio per isolare i due gruppi batterici prevedevano una prima fase di arricchimento in acqua peptonata dei tamponi fecali e ambientali per ESBL-*E. coli*. Il brodo di soia triptico, con aggiunta di sale al 2.5% e gli antibiotici cefoxitina (3.5 mg/L) e aztreonam (20 mg/L), è stato invece utilizzato per la ricerca di MRS in tamponi cutanei, prelevati dall'area ascellare, e in quelli ambientali. Terreni selettivi sono stati impiegati nella seconda fase di isolamento; in particolare, per ESBL-*E. coli*, MacConkey 3 (MCC3) (Oxoid) con cefotaxime (1 mg/L), mentre per isolare le colonie di MRS, l'antibiotico cefoxitina (3.5 mg/L) è stato aggiunto a un Mannitol Salt Agar (MSA) modificato, con 6% di sale. Le piastre sono state incubate in termostato per 24 ore a 37°C. Per MRS, le colonie selezionate per ulteriori esami erano quelle risultate di colore giallo limone e di forma arrotondata sul terreno MSA modificato, mentre per ESBL-*E. coli* le colonie considerate positive erano quelle di colore rosso/viola, con alone rosato attorno e dalla forma arrotondata [10]. Per confermare la presenza di ESBL-*E. coli*, i campioni cresciuti su MCC3 sono stati seminati su Mueller Hinton con l'aggiunta di dischetti antibiotati "cefepodoxime combination disk test" (Oxoid). Dopo la caratterizzazione fenotipica, i campioni sono stati sottoposti ad analisi genotipica. Il DNA è stato estratto da colonie fresche e stoccato a -20°C. I presunti MRS sono stati sottoposti ad una PCR specifica per MRSA (*nuc*, *mecA* e *16s*), e per *mecA* [11]. Il sequenziamento del gene 16S r-DNA è stato usato per l'identificazione batterica. I campioni positivi alla ricerca fenotipica di ESBL-*E. coli*, sono testati con tre singole PCR per la ricerca dei geni *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub>, come descritto in precedenza [12].

## RISULTATI

Abbiamo rilevato una prevalenza di MRS sulla cute dei broiler pari al 43.3% (IC95%: 32.9-54.2), con valori che vanno dallo 0% all'arrivo dei pulcini in allevamento, a 56.7% a 5 giorni e 73.3% a 27 giorni del ciclo produttivo. A livello ambientale, MRS sono stati ritrovati in 8 campioni su 9 (88.8%); tutti i campioni ambientali prelevati a 5 e 27 giorni erano positivi. La presenza del gene *mecA* è stata confermata in tutte le colonie presunte MRS. Il gene *nuc*, specifico per *S. aureus*, non è stato isolato da nessuno dei campioni testati.

La percentuale di *E. coli* produttori di ESBL individuati fenotipicamente nei campioni fecali è 0% a tempo zero, 23.3% (7 su 30 campioni) a 5 giorni e 3.3% (1 su 30 campioni) a 27 giorni, mentre al livello ambientale i campioni positivi sono stati il 33.3% (1 su 3) a 5 giorni e 0% a tempo 0 e a 27 giorni. Le analisi biomolecolari hanno messo in evidenza la presenza del gene *bla*<sub>CTX-M</sub> in 3 campioni animali (2 a 5 giorni, 1 a 27 giorni) su 8, e in 1 campione ambientale. In nessun campione sono stati rilevati i geni *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>.

Tutti i MRS rilevati negli animali sono staphylococchi coagulasi negativi meticillino-resistenti (MRCoNS) appartenenti alla specie *Staphylococcus lentus*, tranne un unico *S. sciuri*. Al livello ambientale è stato identificato solo *S. lentus*.

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti evidenziano che la resistenza a MRS nei campioni animali cresce nel tempo, passando dallo 0% a tempo 0 (giorno in cui i pulcini entrano in allevamento), al 73.3% a 27 giorni, che rappresenta più della metà del ciclo produttivo di un broiler. Anche a livello ambientale i campioni positivi aumentano durante il ciclo produttivo, ma già a tempo zero abbiamo evidenziato MRS in 2 campioni su 3; ciò suggerisce che probabilmente l'ambiente rappresenta l'origine di infezione per gli animali neo-arrivati. Una situazione diversa è stata osservata per ESBL-*E. coli*, assente a tempo 0 sia negli animali che nell'ambiente. Ciò potrebbe indicare che la carica batterica degli ESBL-*E. coli* viene effettivamente azzerata dall'igienizzazione che viene fatta durante il periodo di vuoto tra un ciclo e l'altro. La prevalenza più alta di ESBL-*E. coli* negli animali è stata osservata a 5 giorni (23.3%), dato più basso rispetto all'86% riscontrato nel campionamento nazionale [2] e ad altri Paesi europei come la Germania, dove la percentuale di campioni positivi cecali era del 72.5% [13]. La presenza di *E. coli* produttori di ESBL più alta durante la prima fase del ciclo produttivo può essere dovuta al fatto che tali ceppi si trovano già nell'animale nella fase dell'incubatoio. È stato infatti dimostrata la loro presenza nel seme di broiler riproduttori [14]. Un'altra causa potrebbe essere l'uso di cefalosporine di terza generazione (ceftiofur) nell'incubatoio [15]. Il fatto che sia stato identificato solo *bla*<sub>CTX-M</sub> come gene di resistenza è in accordo con la letteratura, dove risulta essere tra gli ESBL più frequentemente isolati in *E. coli* in animali di allevamento, tra cui i broiler [16,17].

Per quanto riguarda gli staphylococchi isolati in questo studio, essi vengono considerati commensali. Nonostante siano sempre stati considerati innocui, possono manifestare patogenicità in particolari occasioni. Infatti, alcuni di essi come *S. sciuri*, *S. simulans*, e *S. epidermidis* sono stati isolati da dermatiti, tendiniti ed endocarditi negli avicoli [8]. Inoltre, in uno studio è stata trovata una prevalenza del 12.5% di *S. sciuri* meticillino-resistenti in 200 broiler testati in 10 fattorie del Belgio [18], una percentuale più bassa rispetto al 30% riscontrato in un altro studio sempre dallo stesso autore [19]. In un altro studio, il 48.6% di 72 animali campionati in 72 allevamenti svizzeri erano positivi alla ricerca di MRCoNS [6]. Tali studi indicano che i MRCoNS sono tutt'altro che rari nell'allevamento dei polli da carne e dovrebbero pertanto essere tenuti sotto controllo. Oltretutto, i MRCoNS rappresentano un problema di salute pubblica in quanto sono probabili reservoir del gene *mecA*, che può essere trasmesso orizzontalmente al più patogeno *S. aureus* [20]. Pertanto, è sicuramente utile indagare lo stato di meticillino resistenza nei CoNS isolati dai polli per capire se questi ultimi possono fungere da vettori di *mecA* per MRSA.

## CONCLUSIONI

Nonostante lo studio tratti di un solo allevamento broiler, ad oggi questo è l'unico che abbia evidenziato la contemporanea presenza di ESBL-*E. coli* e MRS nell'allevamento dei polli da carne nel nord Italia. Risulta perciò necessario continuare l'approfondimento microbiologico in altri allevamenti avicoli italiani, per comprendere se è un fenomeno isolato o è invece diffuso a livello nazionale. Questa indagine contribuisce inoltre, alla valutazione del rischio microbiologico a cui sono sottoposti i lavoratori nell'allevamento dei broiler, poiché evidenzia la presenza di ESBL-*E. coli* nei primi giorni di vita del broiler e osserva una contaminazione da MRS sia in ambiente che negli animali in quasi tutte le fasi d'ingrasso.

## BIBLIOGRAFIA

1. FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. <http://www.fao.org/fsnforum/resources/fsn-resources/fao-action-plan-antimicrobial-resistance-2016-2020>
2. EUSR on AMR in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2014. *EFSA Journal* 2016; 14(2):4380.
3. Persoons D, Van Hoorebeke S, Hermans K, (2009) et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. *Emerg Infect Dis.*;15(3):452-453. doi:10.3201/eid1503.080696
4. Verhegghé M, Pletinckx LJ, Crombé F, et al. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in pig farms and multispecies farms. *Zoonoses Public Health.*; 60(5):366-374. doi:10.1111/zph.12007
5. Geenen PL, Graat EA, Haenen A, et al. Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms. *Epidemiol Infect.* 2013;141(5):1099-1108. doi:10.1017/S0950268812001616.
6. Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G et al. (2011). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Veterinary Research* 7:6 doi:10.1186/1746-6148-7-6.
7. Kawano J, Shimizu A, Saitoh Y, Yagi M, Saito T, Okamoto R. (1996). Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2072-2077. doi:10.1128/JCM.34.9.2072-2077.
8. Stępień-Pyśniak D, Wilczyński J, Marek A, Śmiech A, Kosikowska U, Hauschild T (2017). *Staphylococcus simulans* associated with endocarditis in broiler chickens. *Avian Pathol*, 46, 44–51.
9. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis*, 2, 677–685
10. Hasman H, Agersø Y, Hendriksen R, Cavaco L and Guerra-Roman B. LABORATORY PROTOCOL- Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat. DTU Food National Food Institute 2018.
11. Multiplex PCR for the detection of the *mecA* gene and the identification of *Staphylococcus aureus*. DTU Food National Food Institute 2009.
12. Nebbia P, Tramuta C, Odore R, Nucera D et al. (2014). Genetic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* producing cefotaximase-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: first evidence of the ST131 clone in cats with urinary infections in Italy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(12) 966–971.
13. Reich F, Atanassova V, and Klein G (2013). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany. *Emerging Infectious Diseases* • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • 19(8): 1253-1259
14. Mezhoud H, Boyenb F, Touazi L, Garmyn A et al. (2015). Extended spectrum -lactamase producing *Escherichia coli* in broiler breeding roosters: presence in the reproductive tract and effect on sperm motility. *Animal Reproduction Science* 159: 205-211
15. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F et al. (2014). Impact of Third-Generation-Cephalosporin Administration in Hatcheries on Fecal *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Broilers and Layers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 58 (9): 5428 –5434

16. Dierikx, CM, van der Goot, JA, Smith, HE, Kant, A. & Mevius, D. J. (2013b). Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One*, 8, e79005
17. Valentin L, Sharpa H, Hille K et al. (2014). Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology* 304:805-816
18. Nemeghaire S, Vanderhaeghen W, Argudi'n MA, Haesebrouck F and Butaye P (2014). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. *J Antimicrob Chemother*; 69: 2928 –2934 doi:10.1093/jac/dku268
19. Nemeghaire S, Argudi'n MA, Haesebrouck F et al. (2014). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* in healthy chickens. *Vet Microbiol*; 171: 357–63
20. Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2010;202(2):270-281. doi:10.1086/653483



# STUDIO DELLA REPLICAZIONE E TRASMISSIONE IN POLLO, TACCHINO E FARAONA DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA H5N8 AD ALTA PATOGENICITA' RESPONSABILE DELL'EPIDEMIA EUROPEA 2019/20 E CONFRONTO CON IL VIRUS H5N8 DEL 2016/17

Bortolami A.<sup>1</sup>, Mazzetto E.<sup>1</sup>, Verin R.<sup>2</sup>, Zanardello C.<sup>1</sup>, Panzarin V.<sup>1</sup>, Scolamacchia F.<sup>1</sup>, Terregino C., Bonfante F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia;

<sup>2</sup> Università di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (PD), Italia.

## Summary

Avian influenza is one of the avian diseases with the highest impact on the poultry sector, in particular highly pathogenic avian influenza viruses (HPAI) in the last twenty years have been responsible of large scale epidemics in the European countries with an increasing frequency. HPAI viruses are characterized by high morbidity and mortality in domestic poultry species and during the last epidemics caused the death or the culling of millions of birds with an enormous economic impact. In this study, we characterized the pathogenicity, infectivity and transmissibility of the first isolate (H5N8/19) of the ongoing epidemic started in December 2019. The same phenotypic traits were studied for an isolate of the 2016/2017 epidemic (H5N8/17). To investigate the pathobiology of those viruses we performed experimental infection in three Gallinaceous species considered relevant for the Italian and European poultry sector: chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). We aimed to determine the viral dose necessary to elicit an infection in susceptible fully-grown birds, the clinical symptoms, the viral excretion of infected birds and the transmission parameters to susceptible contact birds. The results obtained have shown a poor adaptation of both HPAI viruses to domestic poultry and to Galliformes in particular, as it can be inferred by the high bird infectious dose determined in this study. However, the slow progression of the disease resulting in prolonged viral shedding might compensate for the poor adaptation of the viruses of the 2.3.4.4B lineage. In guinea fowls, a species in which the pathology of HPAI viruses is less studied compared to chicken and turkey, the challenge viruses demonstrated high virulence, causing death in less than 48 hours, in absence of overt clinical disease. With relevance to AI surveillance programs, the guinea fowls were asymptomatic before death. The data are the first available describing the phenotypic behavior of the H5N8 HPAI A/turkey/Poland/23/2019 and remarks the importance of the determination of the characteristics and pathogenesis of emerging viruses aiming to produce results useful for the preparation of tailored surveillance and control programs and to better define the risk posed to the public health.

## INTRODUZIONE

Il virus dell'influenza aviaria (IAV), ad oggi, è uno dei patogeni che maggiormente impattano in termini economici e sanitari il settore della produzione avicola. Gli IAV, a seconda delle caratteristiche genetiche e fenotipiche, si possono distinguere in virus a bassa patogenicità (LPAI) e in virus ad alta patogenicità (HPAI). I virus HPAI, a differenza dei virus LPAI, sono in grado di diffondersi rapidamente a livello sistemico

provocando nell'ospite una malattia con alti tassi di mortalità. Nell'ultimo ventennio la maggior parte delle epidemie di HPAI sono state causate da introduzioni multiple di virus presenti nella popolazioni di uccelli selvatici in allevamenti di avicoli domestici. In particolare a partire dal 2014 in Europa si registrano focolai causati da virus del sottotipo H5NX appartenenti lineaggio 2.3.4.4. Questi virus sono stati rilevati per la prima volta nel 2010 in Cina (Zhao et al., 2013), e la loro diffusione ha permesso di categorizzarli in due ulteriori sottogruppi denominati A (Buan-like: A/Broiler-duck/Korea/Buan2/2014) e B (A/breeder-duck/Korea/Gochang1/2014, Gochang-like). La prima introduzione in Europa del virus H5N8 2.3.4.4 risale al 2014 e si limitò ad alcuni focolai in Italia, Germania, Olanda e Regno Unito (Adlhoch et al., 2014), mentre a partire dal 2016/17 una seconda ondata diede inizio ad una pandemia che coinvolse assieme all'Europa, 48 paesi in tutto il mondo (<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2018/>). Dopo circa un anno di stasi, nel dicembre del 2019 un nuovo focolaio causato da un H5N8 HPAI (A/turkey/Poland/23/2019) in un allevamento di tacchini in Polonia segnò l'ingresso di un nuovo virus ad alta patogenicità in Europa. Ad oggi questo virus è responsabile di circa oltre 300 focolai in diverse nazioni dell'Europa Centro Orientale. La grande capacità di ricombinazione e riassortimento genetico, predispone i virus influenzali ad acquisire caratteristiche patogenetiche sempre nuove e difficili da prevedere sulla base delle sole analisi filogenetiche. In questo senso diventa imprescindibile l'utilizzo di studi *in vivo* condotti in modelli animali per definire il fenotipo virale del virus emergente. A tal fine, lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere l'efficienza di trasmissione, il tessuto tropismo e la patogenesi del virus H5N8/19 e di compararlo con il virus H5N8/17 della precedente epidemia nel pollo, nel tacchino e nella faraona.

## **MATERIALI E METODI**

### *Isolamento e produzione dei lotti virali*

Il virus dell'influenza ad alta patogenicità (HPAI) A/turkey/Italy/17VIR9106-2/2017 (H5N8/17, GISAID ID: EPI\_ISL\_316550) e il virus HPAI A/turkey/Poland/23/2019 (H5N8/19, GISAID ID: EPI\_ISL\_402134) sono stati isolati da pool di organi di animali infetti prelevati durante i focolai italiani delle rispettive epidemie. L'isolamento è stato eseguito mediante l'inoculo in uova embrionate SPF (specific pathogen free) secondo quanto previsto dalle procedure standard in uso presso il laboratorio di Virologia Speciale e Sperimentazione animale (SCS-6) dell'IZSVe. Il liquido allantoideo raccolto dall'isolamento virale è stato successivamente titolato mediante diluizioni seriali inoculate in uova SPF embrionate. Per ognuno dei virus la dose infettante il 50% delle uova embrionate (EID<sub>50</sub>) è stata estrapolata mediante l'utilizzo della formula di Reed-Muench.

### *Animali utilizzati negli esperimenti e condizioni di stabulazione*

Per la valutazione delle caratteristiche fenotipiche dei virus precedentemente descritti sono state scelte le seguenti specie avicole: Polli di razza White Leghorn (*Gallus gallus*; schiusi ed allevati presso la sede centrale dell'IZSVe, Legnaro, Italia), tacchini femmine razza White wide-breasted (*Meleagris gallopavo*; Società agricola la Pellegrina, Italia) e faraone (*Numida meleagris*; La Corte, Italia). Gli animali sono stati acclimatati, identificati e stabulati in isolatori Montair 1900 (Montair Process Technology B.V., Olanda) in condizioni di pressione negativa e con sistemi di filtrazione dell'aria in

ingresso e in uscita con filtri ad alta efficienza (*high efficiency particulate air*; HEPA), presso lo stabulario dell'IZSve, in modo da garantire un adeguato livello di biocontenimento e biosicurezza (BSL-3). Da ogni animale è stato prelevato un campione di sangue per valutare la presenza di anticorpi contro l'influenza tramite metodica ELISA (FlockCheck Avian Influenza MultiS-Screen Antibody Test®, IDEXX Laboratories, ME, USA). Inoltre, al momento dell'arrivo, su tutti i soggetti acquistati da allevamenti commerciali (faraone e tacchini) sono stati effettuati tamponi orofaringei (OF) e cloacali (CL) per assicurare l'assenza di infezioni causate da IAV. Tale indagine è stata eseguita utilizzando una RRT-PCR diretta verso il gene M dell'influenza 'H5 and H7 hemagglutinin subtype-specific probe sets were developed based on North American avian influenza virus sequences. The RRT-PCR assay utilizes a one-step RT-PCR protocol and fluorogenic hydrolysis type probes. The matrix gene RRT-PCR assay has a detection limit of 10 fg or approximately 1,000 copies of target RNA and can detect 0.1 50% egg infective dose of virus. The H5- and H7-specific probe sets each have a detection limit of 100 fg of target RNA or approximately 103 to 104 gene copies. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay were directly compared with those of the current standard for detection of influenza virus: virus isolation (VI. Tutte le procedure sono state effettuate in stretto accordo con il decreto del Ministero della salute n. 26 del 4 marzo 2014 riguardante la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, decreto che implementa la Direttiva del Consiglio 2010/63/UE.

#### *Dose infettante media*

Per entrambi i virus si è voluto calcolare la dose media in grado di infettare il 50% degli animali ( $BID_{50}$ ) di ognuna delle tre specie. Gli animali ( $n=15$  per ogni specie) sono stati suddivisi in gruppi di 5 animali ed ogni gruppo è stato infettato per via oro-nasale con le seguenti dosi:  $10^{4.0}$ ,  $10^{5.0}$  e  $10^{6.0}$   $EID_{50}/100 \mu l$ . Al fine di identificare i soggetti positivi, ogni animale è stato monitorato quotidianamente mediante il prelievo di tamponi OP e CL. Non appena prelevati, i tamponi sono stati conservati a  $-80^{\circ}C$  fino al momento delle analisi. Per l'identificazione del gene M alla RRT-PCR i tamponi sono stati scongelati ed immersi in soluzione salina tampone antibiotata. L'estrazione dell'RNA virale è stata ottenuta a partire da  $300 \mu l$  di campione utilizzando il QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit e l'estrattore automatico QIASymphony® SP, secondo le indicazioni fornite dal produttore. Per il controllo della fase di estrazione si è scelto di utilizzare un controllo interno esogeno Intype IC-RNA (Indical). La quantificazione del genoma virale è stata quindi ottenuta tramite metodica RRT-PCR utilizzando il kit QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit (Qiagen) 'H5 and H7 hemagglutinin subtype-specific probe sets were developed based on North American avian influenza virus sequences. The RRT-PCR assay utilizes a one-step RT-PCR protocol and fluorogenic hydrolysis type probes. The matrix gene RRT-PCR assay has a detection limit of 10 fg or approximately 1,000 copies of target RNA and can detect 0.1 50% egg infective dose of virus. The H5- and H7-specific probe sets each have a detection limit of 100 fg of target RNA or approximately 103 to 104 gene copies. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay were directly compared with those of the current standard for detection of influenza virus: virus isolation (VI. Un RNA sintetico utilizzato come standard è stato prodotto seguendo la procedura riportata nel MEGAShortscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen). I dati sono quindi stati analizzati utilizzando il software Bio-Rad CFX Manager software (Version 3.1).

### *Patogenesi*

Gruppi di 8 o 9 animali per ogni specie sono stati infettati per via oculo-nasale con una dose di  $10^{6.0}$  EID<sub>50</sub> del virus H5N8/17 o del virus H5N8/19 al fine di valutare il tempo medio di decesso, il punteggio clinico, l'escrezione virale e la distribuzione virale nei tessuti. A tale scopo, ogni animale è stato monitorato su base giornaliera effettuando dei tamponi OP e CL e registrandone la sintomatologia secondo il seguente criterio di punteggio: 0 animale sano, 1 lievemente malato, 2 malato, 3 gravemente malato e 4 morto. Almeno due animali deceduti per gruppo sono stati sottoposti a necropsopia al fine di prelevare sezioni di trachea, polmone, cervello, timo, intestino tenue, pancreas colon, tonsille ciecali, milza e rene su cui eseguire le indagini istopatologiche e biomolecolari. I tessuti destinati alle analisi istopatologiche sono stati fissati in formalina e paraffina e successivamente colorati in ematossilina eosina per una valutazione istologica o processati mediante colorazione immunoistochimica per determinare la presenza della nucleoproteina del virus dell'influenza A.

### *Trasmissione*

In ogni specie l'efficienza di trasmissione per entrambi i virus è stata valutata applicando il seguente schema sperimentale: quattro (n=4) animali infettati per via oro-nasale con una dose di  $10^6$  EID<sub>50</sub> sono stati messi a contatto con sei (n=6) sentinelle immunologicamente naïve. Per dieci giorni, dal momento dell'infezione, tutti gli animali sono stati monitorati quotidianamente sia per sintomatologia clinica, sia attraverso la raccolta di tamponi OF e CL. Assumendo un modello SIR, è stato ricostruito il processo di trasmissione all'interno di ogni gruppo sperimentale volto a determinare la trasmissibilità dei virus H5N8. A tal fine, i dati sono stati uniformati secondo un formato S, I, C e per ogni intervallo ( $\Delta t$ ) è stato determinato il numero di animali infettivi (I), gli animali suscettibili (S) e il numero di infezioni per contatto (C) avvenute tra gli animali suscettibili. N rappresenta il numero di animali in vita per giorno. È stato considerato retrospettivamente un periodo di latenza di 1 giorno. Il tasso di trasmissione ( $\beta$ ) è stato stimato utilizzando un modello lineare (distribuzione binomiale)<sup>2,3</sup>. Per lo sviluppo del modello sono state stabilite le seguenti assunzioni: che tutti gli animali fossero ugualmente suscettibili, che tutti gli animali fossero ugualmente infettivi e che tutti gli animali fossero ugualmente infettivi per tutta la durata del loro periodo infettante. Inoltre, è stato assunto che ogni animale infetto costituisca un rischio indipendente per l'infezione di un animale suscettibile. Il tasso di riproduzione R può essere stimato prendendo il prodotto del  $\beta$  stimato e la durata media del periodo di infettività. Tutti i calcoli sono stati eseguiti utilizzando il software R v 3.5.3<sup>4</sup>.

### *Statistica*

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Graph Pad Prism 8.0. I dati sono stati confrontati mediante un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie. In caso di risultato significativo all'ANOVA, i confronti multipli (analisi post hoc) sono stati eseguiti utilizzando la correzione di Sidak. Il limite per definire la significatività statistica è stato stabilito con  $p\text{-value} < 0.5$ .

## **RISULTATI**

### *Minima dose infettante*

Per il virus H5N8/19 è stata osservata una BID<sub>50</sub> di  $10^{4.9}$  EID<sub>50</sub> nel pollo, di  $10^{5.6}$  EID<sub>50</sub>

nel tacchino, e di  $10^{5.3}$  EID<sub>50</sub> nella faraona. Valori molto simili sono stati registrati per le tre specie anche nella prova di infezione con il virus H5N8/17 (pollo  $10^{5.2}$  EID<sub>50</sub>, tacchino  $10^{5.30}$  EID<sub>50</sub>, faraona  $10^{5.1}$  EID<sub>50</sub>) confermando la necessità di una dose di infezione maggiore nel tacchino rispetto al pollo e alla faraona per infettare almeno la metà degli animali.

### *Patogenesi*

La sintomatologia registrata per ogni animale direttamente infettato a livello sperimentale con il virus H5N8/19 o il virus H5N8/17 è stata riportata nei grafici di Figura 1. Come si evince dall'immagine, il decorso della malattia nel pollo è comparabile nei due gruppi infettati: indipendentemente dal virus, gli animali hanno mostrato sintomatologia grave entro i 2 giorni dall'inizio dell'infezione, portando a morire tutti gli animali entro i 3-5 giorni. Anche le MDT dei due virus risultano essere molto simili, con un ritardo di circa mezza giornata nel virus H5N8/19 (MDT di 4 giorni) rispetto al virus H5N8/17 (MDT di 3.57 giorni). Nei tacchini, nonostante il confronto tra i due virus abbia rilevato una MDT comparabile (H5N8/19 MDT di 5 giorni e H5N8/17 MDT di 5.33 giorni), la sintomatologia negli animali infettati con il virus H5N8/19 è apparsa più grave registrando valori significativamente più alti a due giorni post-infezione. Nelle faraone i segni clinici e la MDT (H5N8/19 MDT di 2.11 giorni e H5N8/17 MDT di 2.44 giorni) sembrano aver evidenziato un decorso della malattia più grave e rapido nel caso di infezione con il virus H5N8/19 ma a livello di sintomatologia le differenze significative tra i due virus rimangono limitate al secondo giorno post-infezione. La valutazione dell'escrezione media virale è stata quantificata mediante le analisi biomolecolari sui tamponi OP e CL raccolti giornalmente per tutta la durata della sperimentazione. Dalla figura 2 è possibile osservare la quantità genomica eliminata per via orofaringea e cloacale da ogni animale nel tempo. Tutti i tessuti raccolti per le indagini biomolecolari sono risultati positivi per la presenza di genoma virale. In particolare, sia nel pollo che nel tacchino, indipendentemente dal virus di infezione, il numero più alto di copie genomiche è stato osservato a livello di cervello, mentre nelle faraone, sia per il virus H5N8/17 che per il virus H5N8/19, i titoli virali più alti sono stati riscontrati principalmente nei polmoni. A conferma di quanto rilevato dalle analisi biomolecolari anche le indagini istopatologiche hanno evidenziato la presenza della nucleoproteina del virus influenzale nella maggior parte dei tessuti prelevati (Tabella 1).

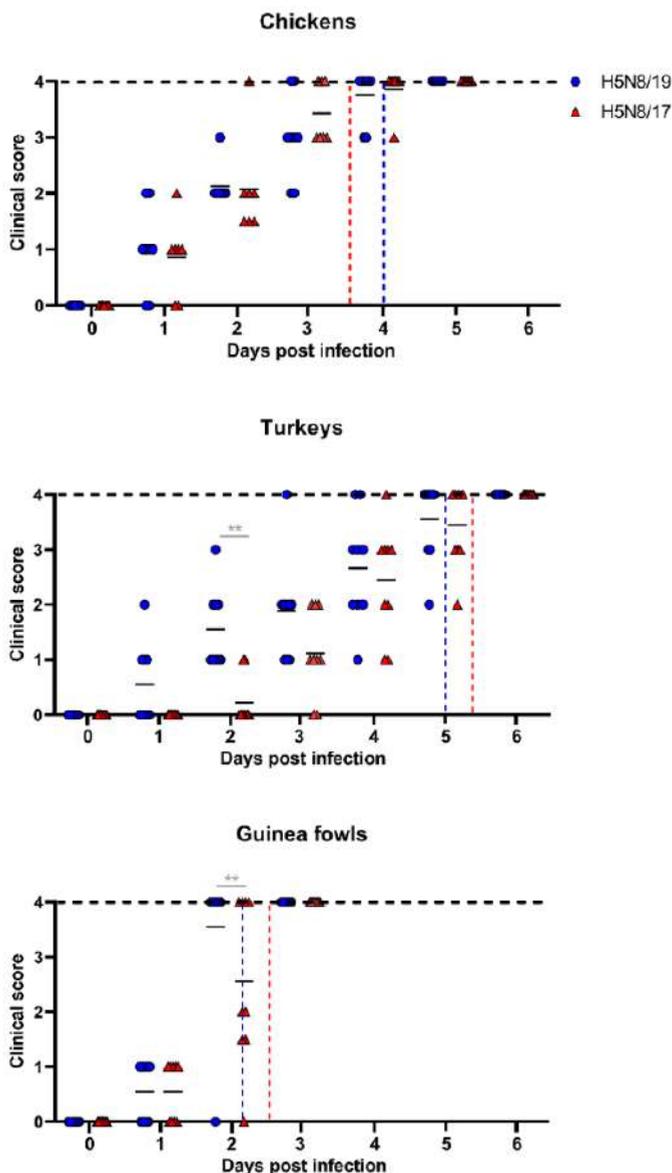
### *Trasmissione*

Tutti i polli infettati direttamente con il virus H5N8/19 e tutte le sentinelle esposte sono morti rispettivamente entro 4 e 7 giorni. Negli animali infettati l'escrezione del virus ha raggiunto il picco a 3 giorni post-infezione mentre le sentinelle hanno iniziato ad eliminare virus a partire dal quarto giorno post-esposizione. L'andamento dell'infezione è risultato molto simile anche nel gruppo infettato con il virus H5N8/17, a parte per un una delle sentinelle per la quale non è mai stata rilevata eliminazione virale, confermata dall'assenza di sierconversione a 21 giorni post-esposizione. I tacchini inoculati con il virus H5N8/19 sono stati trovati morti entro i 5 giorni post infezione, mentre le rispettive sentinelle sono morte entro i 7 giorni post-esposizione. Nel gruppo di trasmissione del virus H5N8/17 è stato osservato un decorso della malattia più lento che ha portato gli animali direttamente infettati a morire entro i 6 giorni dall'infezione, mentre le sentinelle sono state ritrovate tutte morte entro gli 8 giorni post-esposizione. Nelle faraone,

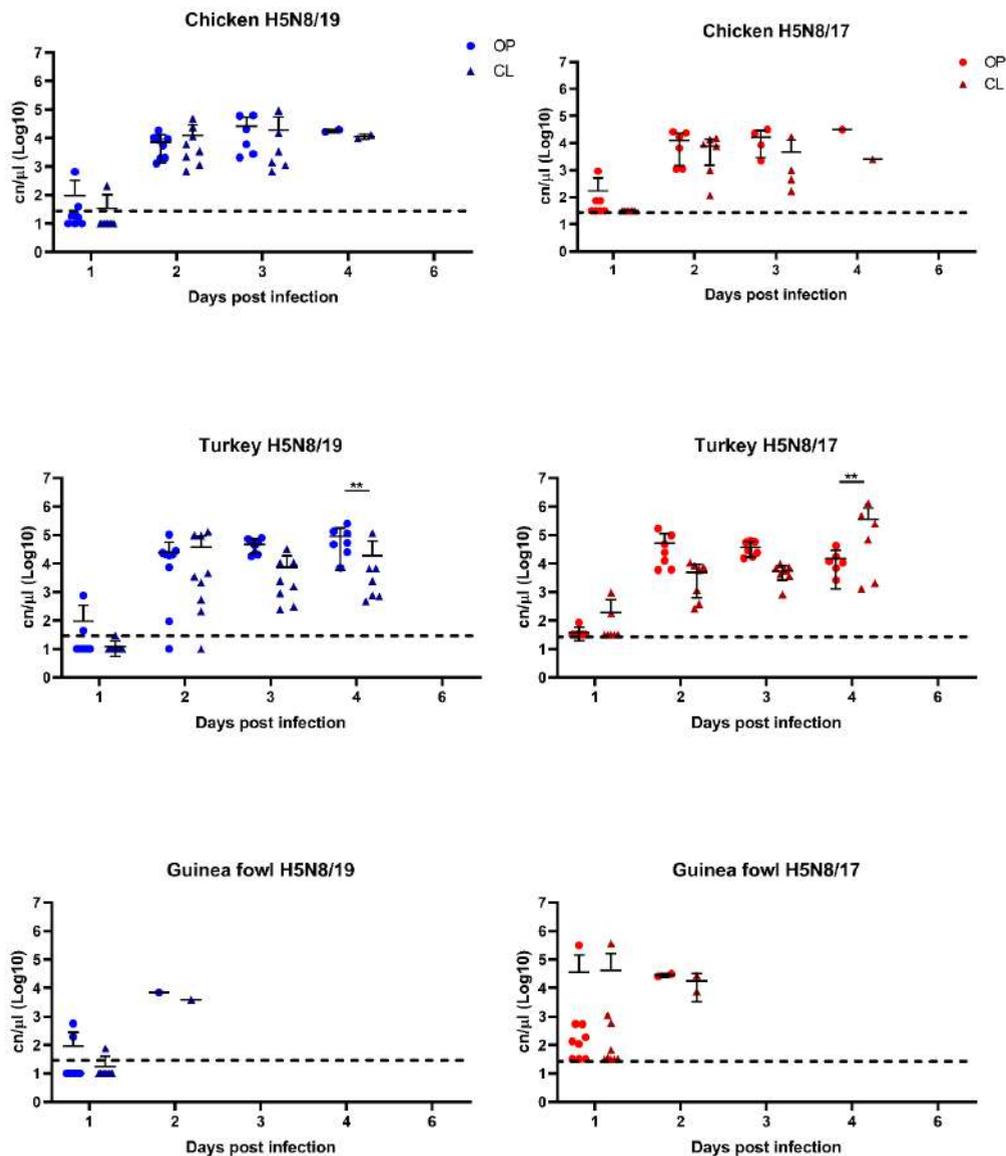
indipendentemente dal virus utilizzato, il decorso della malattia negli animali infettati in modo diretto ha raggiunto la mortalità del 100% entro i 3 giorni post-infezione. Nel gruppo infettato con il virus H5N8/19 solo 3 sentinelle su 6 si sono infettate mentre nel gruppo infettato con il virus H5N8/17 la trasmissione è risultata più efficiente portando all'infezione di tutte le sentinelle esposte (Figura 4). Da questi dati l'analisi dell'efficienza di trasmissione ha estrapolato il tasso R e quindi la capacità dei due virus H5N8 di diffondere nelle tre diverse specie (Tabella 2).

## DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Nel corso del presente studio sono state analizzate le caratteristiche fenotipiche di virus rappresentativi dei virus responsabili delle ultime due ondate epidemiche in Europa (2016/2017 e 2019/2020) in un contesto emergenziale con lo scopo di fornire dati attuali ad epidemia in corso. I risultati ottenuti non hanno mostrato differenze sostanziali tra i due virus utilizzati nelle prove sperimentali, ma hanno dimostrato alcune importanti caratteristiche che sembrano essere conservate nel lineaggio 2.3.4.4B. L'elevata dose infettante richiesta per infettare le diverse specie avicole testate è estremamente elevata e atipica per dei virus HPAI <sup>5,6</sup>the emergence of closely related viruses in poultry has raised concerns that additional zoonotic transmissions of influenza viruses from poultry to humans may occur. In May 2001, an avian H5N1 influenza A virus was isolated from duck meat that had been imported to South Korea from China. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA. Questo dato suggerisce la necessità di un'esposizione ad alte cariche virali per l'instaurarsi dell'infezione in un allevamento ponendo quindi l'accento sull'importanza delle misure di biosicurezza per un efficace controllo della diffusione di questi virus poco adattati al pollame. I risultati invece ottenuti nelle prove di patogenesi hanno evidenziato una lenta progressione della malattia, come indicato da valori di MDT insolitamente elevati, che consentono agli animali infetti di eliminare virus per un periodo prolungato di tempo. Questo dato unito ai dati di eliminazione virale e di sintomatologia clinica osservati indicano la possibile esistenza di un intervallo di tempo significativo in cui il virus può essere escreto da animali infetti senza che questi dimostrino sintomatologia evidente, con possibili gravi ritardi nella notifica di sospetti. Nelle faraone invece il quadro osservato si discosta da quanto visto in pollo e tacchino e il decorso della malattia è risultato molto rapido e accompagnato da una scarsa eliminazione di virus e da un'assenza di sintomatologia clinica. Le lesioni osservate negli animali che sono deceduti a seguito dell'infezione hanno mostrato una distribuzione e gravità tipiche dei ceppi HPAI, con l'eccezione di un marcato neurotropismo e mancanza di tropismo per gli endoteli. Il tropismo per gli endoteli è una caratteristica tipica di virus HPAI a maggiore virulenza, pertanto la lenta progressione della malattia potrebbe essere dovuta a tale mancanza <sup>7</sup>. Le prove di trasmissibilità hanno inoltre mostrato la scarsa capacità del virus di diffondere rapidamente in pollo e tacchino, come mostrato dai tassi di riproduzione visibili in Tabella 2. Il rapido decorso della malattia e la scarsa eliminazione virale osservate nelle faraone sono probabilmente alla base della scarsa diffusibilità osservata ed evidenziata da un tasso di riproduzione di 0.2 e da una morbilità del 50% (3/6 sentinelle infette) con il virus H5N8/19. I risultati ottenuti hanno quindi mostrato come i virus appartenenti al lineaggio 2.3.4.4B posseggano caratteristiche peculiari e si differenzino notevolmente da quanto osservato con altri virus del lineaggio Gs/Gd, dimostrando come sia necessario lo studio del fenotipo virale per poter ottenere informazioni adeguate allo sviluppo di sistemi di sorveglianza e contenimento nel corso di un'emergenza epidemica.



**Figura 1.** Confronto della sintomatologia clinica riscontrata in polli, tacchini e faraone infettate con H5N8/19 (blu) o H5N8/17 (rosso). Criterio di punteggio assegnato per animale: 0 animale sano, 1 lievemente malato, 2 malato, 3 gravemente malato e 4 morto. Le linee verticali tratteggiate indicano la MDT dei rispettivi gruppi. Gli asterischi (\*\*) indicano una differenza significativa della sintomatologia osservata tra i gruppi infettati con il virus H5N8/19 rispetto a quelli infettati con il virus H5N8/17. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$

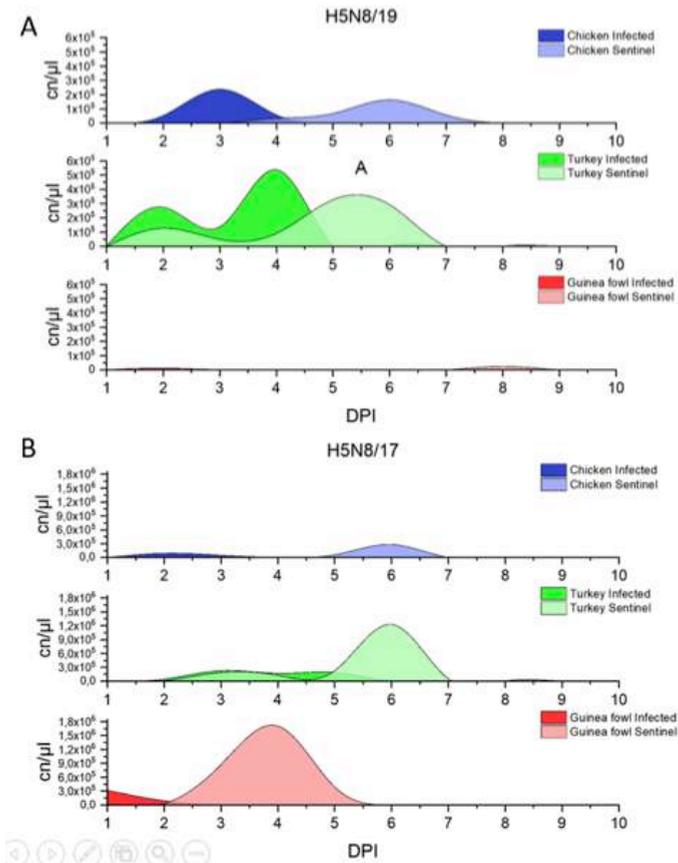


**Figura 2.** Confronto tra le quantità di virus eliminato nel tempo per via orofaringea (OP) e cloacale (CL) dagli animali infetti. La carica virale è espressa in copie genomiche per microlitro (cn/μl). La linea orizzontale tratteggiata indica il limite di quantificazione della metodica qRRT-PCR. Gli asterischi (\*\*) indicano una differenza significativa della carica virale rilevata a seconda della tipologia di campionamento utilizzato (tampone OP vs CL). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

Organi		Lesioni	Pollo		Tacchino		Faraona	
			H5N8/19	H5N8/17	H5N8/19	H5N8/17	H5N8/19	H5N8/17
Trachea	IHC		-	+	+	+	++	+
	Lesioni	Necrosi epiteliale	-	-	-	+/-	+	+
		Tracheite	-	-	-	-	+/-	+/-
Polmoni	IHC		++++	+++	++	+	++++	+++
	Lesioni	Polmonite interstiziale	+	+	+	+	+++	++
Intestino	IHC		+	+	+++	++	+++	++
	Lesioni	Emorragie	+	+	+	+	+	-
		Deplezione linfoide	+	+	+	+	+	+
		Necrosi epiteliale	++	++	+++	++	++	+
		Enterite	++	++	++	++	++	++
Pancreas	IHC Score		+++	+++	+++++	++++	+	-
	Lesioni	Necrosi pancreatica	++	++	++++	++++	+/-	+/-
Timo	IHC		++	+++	+++	++	+++	++
	Lesioni	Deplezione linfoide	++	++	++	++	+	++
Milza	IHC		++	++	+	+	+++	++
	Lesioni	Deplezione linfoide	++	++	+++	+++	++	++
		Necrosi splenica	-	-	++	++	-	-
Rene	IHC Score		++	+++	++	++	+/-	+
	Lesioni	Necrosi tubulare	+/-	+	++	++	+/-	+/-
Fegato	IHC		+	+	-	+	+	+
	Lesioni	Necrosi epatocellularre	-	-	-	-	+/-	+/-
		Infiltrato periportale	++	++	-	+/-	-	++
Cervello	IHC		++++	++++	+++++	+++++	+++	++
	Lesioni	Edema dei neutrofilii	+	+	+	+	+	+
		Necrosi neuronale	++	++	++	++	++	+
		Gliosi	++	++	++	++	+++	++

**Tabella 1.** Punteggio delle lesioni istopatologiche: - = nessuna lesione; +/- = lesioni rare ; + = lesioni minime; ++ = lesione lievi; +++ = lesione moderata; ++++ = lesioni gravi ; +++++ = Perdita completa della struttura tissutale

IHC: Indica la distribuzione dell'antigene della nucleoproteina virale del virus dell'influenza H5N8: = negativo; + = presenza occasionale di cellule positive; ++ = poche cellule positive; +++ = numero moderato di cellule positive; 4 ++++ = numerose cellule positive; +++++ = positività estesa.



**Figura 4.** Confronto tra le quantità cumulative di virus escreto dagli animali (polli, tacchini e faraone) infettati con H5N8/19 (A) o H5N8/17 (B). La carica virale è espressa in copie genomiche per microlitro (cn/μl).

Virus	Specie	$T_i$ (days; 95% CI) <sup>a</sup>	$\beta$ (95% CI) bird <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup>	$R$
H5N8/19	<b>Pollo</b>	2 (1,34 - 2,66)	1,03 (0,41-2,12)*	2,1*
	<b>Tacchino</b>	1,83 (1,04 - 2,62)	1,91 (0,74-4,04)	3,5
	<b>Faraona</b>	0,33 (0 - 0,87)	0,48 (0,08-1,49)	0,2
H5N8/17	<b>Pollo</b>	1,66 (0,58 - 2,75)	0,66 (0,23-1,41)	1,1
	<b>Tacchino</b>	3,3 (2,48 - 4,19)	1,35 (0,48-3)	4,5
	<b>Faraona</b>	2,16 (0,77 - 3,56)	2,49 (0,95-5,45)	5,4

**Tabella 2.** Parametri di trasmissibilità del virus H5N8/19 e del virus H5N8/17 in pollo, tacchino e faraona calcolati utilizzando un modello SIR.

## BIBLIOGRAFIA

1. Spackman, E. *et al.* Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* (2002). doi:10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002
2. Van der Goot, J. A., De Jong, M. C. M., Kochi, G. & Van Boven, M. Comparison of the transmission characteristics of low and high pathogenicity avian influenza A virus (H5N2). *Epidemiol. Infect.* **131**, 1003–1013 (2003).
3. Van Der Goot, J. A., Koch, G., De Jong, M. C. M. & Van Boven, M. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18141–18146 (2005).
4. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (2019).
5. Bertran, K. *et al.* Pathobiology and innate immune responses of gallinaceous poultry to clade 2.3.4.4A H5Nx highly pathogenic avian influenza virus infection. *Vet. Res.* (2019). doi:10.1186/s13567-019-0704-5
6. Tumpey, T. M. *et al.* Characterization of a Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from Duck Meat. *J. Virol.* (2002). doi:10.1128/jvi.76.12.6344-6355.2002
7. Short, K. R., Veldhuis Kroeze, E. J. B., Reperant, L. A., Richard, M. & Kuiken, T. Influenza virus and endothelial cells: A species specific relationship. *Frontiers in Microbiology* (2014). doi:10.3389/fmicb.2014.00653



## VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI VACCINI INNOVATIVI PRODOTTI IN PIANTA E SVILUPPO DI UNA STRATEGIA DIVA PER LA MALATTIA DI GUMBORO

Bortolami A.<sup>1</sup>, Marusic C.<sup>2</sup>, Drissi Touzani C.<sup>3</sup>, Donini M.<sup>2</sup>, Lico C.<sup>2</sup>, Rage E.<sup>2</sup>, Bonfante F.<sup>1</sup>, Zanardello C.<sup>4</sup>, Mazzacan E.<sup>1</sup>, El Houadfi M.<sup>3</sup>, Terregino C.<sup>1</sup>, Baschieri S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SCS6 - *Virologia Speciale e Sperimentazione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia*

<sup>2</sup> *Laboratorio Biotecnologie, ENEA Centro Ricerche Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Santa Maria di Galeria RM, Italia*

<sup>3</sup> *Unité de Pathologie Aviaire, Département de Pathologie et Santé Publique Vétérinaire, IAV Hassan II, BP 6202, Rabat Instituts, 10000 Rabat, Morocco*

<sup>4</sup> SCS3 - *Diagnostica specialistica, istopatologia e parassitologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia*

### Summary

Infectious bursal disease (IBD) or Gumboro disease is an acute and highly contagious disease affecting young chickens. Gumboro disease is caused by the infectious bursal disease virus (IBDV), a member of the *Birnaviridae* family, genus *Avibirnavirus*, characterized by a bi-segmented double stranded RNA genome enclosed in a non-enveloped capsid. IBDV is endemic in Italy and control of IBD is achieved by vaccination with intermediate and intermediate plus live vaccines and inactivated boosters in breeders. Recently, novel vaccines based on recombinant vectors expressing the protective antigen have been introduced. In our study we evaluated the protective efficacy of a plant-produced subunit vaccine for IBD and developed an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) capable of differentiating vaccinated from infected chickens, thus allowing a differentiating vaccinated from infected animals (DIVA) strategy. Specific pathogen free (SPF) chickens were vaccinated intramuscularly with either purified IBDV-VP2, a commercial inactivated vaccine or phosphate buffered saline (PBS). Immune response was measured with a commercial ELISA kit. Eight days after the last immunization chickens were challenged with a very virulent IBDV strain via the oculo-nasal route. Clinical signs and mortality were recorded daily. Post-mortem examination at the day of death or at the end of the experiment and histopathological examination of harvested bursae of Fabricius was performed. No clinical signs or mortality were observed in the vaccinated groups, while all the sham-vaccinated chickens succumbed to the infection by day 5. Robust seroconversion was observed in the group vaccinated with the plant-produced VP2 antigen, reaching levels comparable to the ones observed in the chickens vaccinated with the commercial vaccine, which resulted in clinical protection as demonstrated by absence of clinical signs and limited bursal depletion. A house-made ELISA based on a different plant-produced IBDV protein was developed and tested with the sera collected during the experimental trial. The ELISA was able to correctly differentiate chickens immunized only with VP2 from animal immunized with the whole virus before the challenge. Further studies are needed to evaluate the ability of the vaccine to overcome maternal immunity and for the DIVA test to identify outbreaks in flocks vaccinated with VP2 based vaccines.

## INTRODUZIONE

La malattia di Gumboro o bursite infettiva è una patologia causata da un virus a RNA a doppio filamento (dsRNA) appartenente alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus* (1). L'IBDV è un virus con capside a simmetria icosaedrica privo di *envelope*. Sono stati identificati due sierotipi di IBDV: il sierotipo 1 comprende ceppi classici, varianti e *very virulent*, mentre nel sierotipo 2 sono compresi esclusivamente ceppi apatogeni. Il virus della bursite infettiva colpisce i linfociti B immaturi presenti nella borsa di Fabrizio. Le conseguenze dell'infezione dipendono dal ceppo responsabile e dall'età dell'animale ma risultano in una immunosoppressione più o meno grave. I ceppi *very virulent* (vvIBDV), isolati inizialmente in Olanda nel 1986 e successivamente diffusi in quasi tutti i continenti, sono caratterizzati da elevata mortalità che può raggiungere il 5%-25% nei broiler e il 30%-70% nelle ovaiole. L'infezione causata dai ceppi *very virulent* causa lesioni pronunciate a carico di muscoli e borsa di Fabrizio associati a una rapida regressione del timo e della borsa a seguito dell'infezione (2). I ceppi vvIBDV sono contraddistinti da specifiche mutazioni nella regione ipervariabile della VP2 in posizione 222 (Ala), 256 (Ile) e 294 (Ile) che sembrano essere associate all'aumento di patogenicità. In Italia studi effettuati negli anni passati hanno mostrato la circolazione di ceppi classici, *very virulent* e più recentemente l'insorgenza di ceppi del genotipo ITA (G6) responsabili di una patologia a decorso subclinico (3) either classical or very virulent, retrieved from GenBank or previously reported in Italy, and from vaccine strains. The new genotype shows peculiar molecular characteristics in key positions of the VP2 hypervariable region, which affect charged or potentially glycosylated amino acids virtually associated with important changes in virus properties. Characterization of 41 IBDV strains detected in Italy between 2013 and 2014 showed that ITA is emergent in densely populated poultry areas of Italy, being 68% of the IBDV detections made during routine diagnostic activity over a two-year period, in spite of the immunity induced by large-scale vaccination. Four very virulent strains (DV86. In Italia la situazione epidemiologica ha portato quindi l'utilizzo diffuso della vaccinazione come mezzo di controllo per prevenire la mortalità e il calo delle performances dovuto all'infezione da IBDV. La maggior parte dei vaccini disponibili attualmente si basa su virus inattivati o vivi attenuati, questi ultimi, a seconda della tipologia, dotati di una virulenza residua più o meno marcata. Vaccini di nuova generazione basati su un vettore ricombinante in grado di esprimere la proteina VP2 dell'IBDV sono stati messi recentemente in commercio. Il capside del virus è infatti costituito in larga parte da proteine VP2 che assieme alle proteine VP3, presenti in misura minore, costituiscono i principali antigeni verso i quali viene sviluppata una risposta immunitaria a seguito dell'infezione. Gli anticorpi prodotti contro la proteina VP2 sono tuttavia i soli responsabili della neutralizzazione virale.

Lo scopo del presente studio è stato quello di verificare l'efficacia di vaccini innovativi basati sulla VP2 prodotti in piante e di sviluppare una strategia in grado di differenziare animali infetti da animali vaccinati con vaccini basati sulla VP2 (*Differentiating Vaccinated from Infected Animals*, DIVA).

## MATERIALI E METODI

Gli antigeni utilizzati nel presente studio sono stati prodotti presso il Laboratorio Biotecnologie dell'ENEA Centro Ricerche Casaccia tramite metodica di trasforma-

zione transiente in piante di *Nicotiana benthamiana*. Le proteine prodotte sono state estratte dai tessuti vegetali omogenati mediante filtrazione e purificazione tramite un cuscinetto di saccarosio. Per valutare l'efficacia protettiva della proteina VP2 prodotta in pianta sono quindi stati utilizzati polli SPF di 8 giorni suddivisi in gruppi di sei animali e immunizzati per via intramuscolare con una preparazione di VP2 risospesa in ISAMONTANIDE 71VG (gruppo VP2), con un vaccino commerciale (gruppo C+) a base di IBVD inattivato (Nobilis®) o con PBS (gruppo C-). Tutti gli animali sono stati vaccinati a 8, 21 e 35 giorni. Otto giorni dopo l'ultima immunizzazione è stato effettuato un challenge con un ceppo di campo di vvIBDV per via oculo-nasale presso gli stabulari dell'Agronomy and Veterinary Institute Hassan II, Rabat, Morocco. Gli animali sono stati monitorati quotidianamente per la presenza di sintomatologia clinica e al termine della sperimentazione (10 giorni p.i.) i polli sono stati soppressi per la valutazione delle lesioni anatomopatologiche e per la raccolta delle borse di Fabrizio successivamente inviate all'IZSVe per esame istologico. Per la valutazione dei titoli anticorpali sono stati utilizzati un kit commerciale (ProFLOCK® infectious bursal disease virus antibody test kit, Synbiotics Corporation, San Diego, USA) ed un test ELISA indiretto sperimentale volto a rilevare la presenza di anticorpi specifici verso una differente proteina virale.

## RISULTATI

I polli vaccinati con il preparato di VP2 prodotto in pianta hanno mostrato la produzione di livelli anticorpali simili a quelli osservati nel gruppo di animali vaccinati con il vaccino commerciale. A seguito del challenge con vvIBDV gli animali del gruppo VP2 e C+ non hanno mostrato sintomatologia clinica evidente, mentre nei polli del gruppo C- **è stata osservata sintomatologia clinica riferibile** alle forme sostenute da ceppi vvIBDV che ha portato a morte gli animali entro il quinto giorno post infezione. L'esame anatomopatologico ha mostrato la presenza nei polli del gruppo C- di lesioni tipiche (petecchie a livello muscolare, atrofia di timo e borsa di Fabrizio), mentre negli animali dei due gruppi vaccinati non sono state rilevate alterazioni macroscopiche. L'esame istologico ha confermato le lesioni osservate a livello macroscopico nel gruppo C- con grave deplezione linfocitaria nei follicoli della borsa di Fabrizio e perdita dell'architettura follicolare, mentre negli animali vaccinati sono state osservate alterazioni da assenti a moderate caratterizzate da deplezione linfocitaria ed infiltrazione da parte di macrofagi ed eterofili. Il test ELISA basato su un'altra proteina virale ha consentito di identificare correttamente gli animali vaccinati con virus intero o con VP2 con una specificità del 100% e di verificare la sierconversione negli animali del gruppo VP2 a seguito del challenge.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'IBDV è causa di importanti perdite economiche per il settore avicolo a livello mondiale per la mortalità e l'immunosoppressione conseguenti all'infezione. I vaccini attualmente disponibili presentano diverse problematiche relative alla sicurezza dei ceppi vivi attenuati utilizzati nella pratica comune e talvolta alla protezione parziale offerta nei confronti dei ceppi maggiormente virulenti (4). Per questo motivo negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi vaccini di nuova generazione basati su vettori ricombinanti in grado di indurre immunità protettiva senza produrre lesioni a livello bursale. La produzione di vaccini in pianta offre notevoli vantaggi in ter-

mini di costi di produzione, scalabilità e sicurezza. I risultati ottenuti hanno mostrato come le proteine ricombinanti prodotte utilizzando la piattaforma vegetale siano state in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva comparabile con quella indotta utilizzando vaccini inattivati disponibili in commercio. Studi precedenti effettuati inoculando la forma monomeric della VP2 hanno mostrato solo protezione parziale a seguito di infezione con ceppi classici (5), mentre nel presente studio è stata ottenuta una protezione del 100% a seguito di infezione con ceppi *very virulent*, dimostrando pertanto ottime potenzialità per l'applicazione in campo, come alternativa a basso costo e con maggiori margini di sicurezza rispetto ai vaccini attualmente in commercio. I risultati ottenuti dal test ELISA basato su un'altra proteina virale hanno mostrato un'ottima sensibilità nell'individuare animali vaccinati o infettati con virus di campo. Al momento non vi sono in commercio test sierologici in grado di offrire una strategia DIVA per la bursite infettiva pertanto i risultati ottenuti dal test ELISA messo a punto che permette di differenziare animali immunizzati con la VP2 da animali naturalmente infetti, offrono nuove importanti prospettive per il controllo della malattia.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Van Den Berg TPD. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathol.*
2. Ignjatovic J. 2004. Very virulent infectious bursal disease virus. *Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures.*
3. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M, Catelli E. 2016. A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.*
4. Müller H, Mundt E, Eterradossi N, Islam MR. 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.*
5. Wu H, Singh NK, Locy RD, Scissum-Gunn K, Giambrone JJ. 2004. Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Avian Dis.*

# VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI BIOFILM DA PARTE DI DIVERSE SPECIE DI MICOPLASMI ISOLABILI IN SPECIE AVICOLE INDUSTRIALI

Bottinelli M.<sup>1</sup>, Picchi M.<sup>1</sup>, Tondo A.<sup>1</sup>, De Grandi G.<sup>1</sup>, Fincato A.<sup>2</sup>, Rossi I.<sup>1</sup>, Merenda M.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT3 Laboratorio sierologia e malattie pianificate, viale dell'università, 35020 Legnaro (PD), Italy.

## Summary

Recent studies reported some mycoplasmas are able to produce biofilm, which seems to make them more resistant to surrounding stresses in the host and in the environment. At present, there is no study aimed at assessing this ability in different avian *Mycoplasma* field strains. Thus, it was decided to investigate the major avian *Mycoplasma* species, in particular *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM), *M. iowae* (MI), as well as some minor ones, including *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners* and *M. pullorum*. A total of 40 isolates were inoculated into a specific broth medium in 48-well microtiter plates. After incubation, the plates were washed and stained at two different times for optical biofilm formation evaluation. Thirty-five percent of the isolates produced biofilm. Four MG isolates, three MS isolates and three MM isolates were biofilm producers. Only one isolate of each minor avian *Mycoplasma* species produced biofilm and none of MI isolates was biofilm producer. Interestingly, not all the examined avian isolates are able to produce biofilm *in vitro*. It is important to continue studying the ability of producing biofilm in avian mycoplasmas since this could be a key feature for understanding better their epidemiology.

## INTRODUZIONE

I micoplasmi sono microrganismi considerati “parassiti obbligati” degli epiteli del tratto respiratorio e genitourinario degli animali e dell'uomo (1). Sebbene non abbiano una parete cellulare e siano apparentemente danneggiabili dal sistema immunitario dell'ospite, i micoplasmi riescono a persistere nei siti di colonizzazione anche in presenza di una forte risposta infiammatoria. Inoltre, sono sensibili agli agenti atmosferici al di fuori dell'ospite. Tuttavia è stato osservato che alcuni micoplasmi sono in grado di sopravvivere in presenza di condizioni avverse, come superfici solide, e di persistere nell'ambiente più di quanto ci si aspetterebbe (2). Sappiamo che per altre specie batteriche la capacità di produrre biofilm, ovvero la creazione di strati di cellule batteriche circondate da una matrice polisaccaridica *gel-like*, è connessa con un'aumentata resistenza agli antibiotici e alla risposta immunitaria dell'ospite (3). Studi recenti hanno dimostrato che anche alcuni micoplasmi sono in grado di produrre biofilm e tale capacità potrebbe spiegare come mai le infezioni da micoplasmi siano difficili da trattare con gli antibiotici, oppure il motivo per cui diventino croniche (4). Inoltre, data l'insorgenza di nuovi focolai in assenza di connessioni epidemiologiche evidenti, è lecito pensare che tramite

il biofilm i micoplasmi possano sopravvivere lontano dalla risposta immunitaria e gli agenti atmosferici per poi tornare a dare malattia in un secondo momento. Sono ben noti i problemi causati dalle micoplasmosi nell'industria avicola, sia in termini di perdite economiche che produttive. Studiare la capacità dei micoplasmi aviari di produrre biofilm potrebbe aiutare a comprendere meglio le enigmatiche dinamiche epidemiologiche che caratterizzano le micoplasmosi del settore avicolo. Tuttavia, non sono disponibili dati riguardanti tale capacità nei ceppi di campo. Per questo motivo abbiamo deciso di valutare se alcune specie di micoplasmi isolabili nel pollame fossero in grado di produrre biofilm.

## **MATERIALI E METODI**

### *Selezione dei ceppi*

Per questo studio sono stati utilizzati i ceppi presenti nella ceppoteca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Le specie di micoplasma incluse nello studio sono: *Mycoplasma (M.) gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, *M. iowae*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners* e *M. pullorum*. Per ogni specie di micoplasma sono stati selezionati cinque ceppi. Come controllo positivo sono stati selezionati due ceppi di *M. gallisepticum* produttori di biofilm (*M. gallisepticum* S6 e *M. gallisepticum* 6/85).

### *Coltivazione in vitro dei ceppi*

Il protocollo di coltivazione dei ceppi è basato su quanto riportato da McAuliffe e collaboratori (2006) a cui sono state apportate alcune modifiche descritte qui di seguito. I ceppi sono stati coltivati in terreno selettivo sterile per micoplasmi. Ogni ceppo è stato inoculato in un pozzetto di una piastra da 48 pozzetti contenente il terreno selettivo. Ogni ceppo è stato coltivato in duplicato. Ad ogni piastra è stato aggiunto del terreno selettivo sterile come controllo negativo. Le piastre, sigillate in superficie, sono state incubate a 37°C in aerobiosi per 28 giorni.

### *Visualizzazione del biofilm e classificazione dei ceppi produttori*

La procedura per la visualizzazione del biofilm è stata effettuata a 28 giorni post-inoculo. Brevemente, la piastra veniva sciacquata con acqua distillata e poi colorata con una soluzione di cristalvioletto allo 0.5%. La presenza di biofilm veniva confermata dall'osservazione della colorazione permanente del fondo del pozzetto.

## **RISULTATI**

Su un totale di 40 ceppi coltivati, 14 (35%) hanno prodotto biofilm (vedi Tabella 1). Una certa variabilità nella produzione di biofilm è stata osservata tra le varie specie analizzate. Quattro ceppi di *M. gallisepticum*, tre ceppi di *M. synoviae* e tre ceppi di *M. meleagridis* hanno prodotto biofilm. Nessun ceppo di *M. iowae* ha prodotto biofilm. Le restanti specie di *Mycoplasma* studiate hanno mostrato la produzione di biofilm in una percentuale più bassa (solo un ceppo su cinque).

**Tabella 1:**

Specie di <i>Mycoplasma</i>	Produzione di biofilm				
	I ceppo	II ceppo	III ceppo	IV ceppo	V ceppo
<i>M. gallisepticum</i>	+	+	+	-	+
<i>M. synoviae</i>	-	+	-	+	+
<i>M. meleagridis</i>	+	-	+	-	+
<i>M. iowae</i>	-	-	-	-	-
<i>M. gallinarum</i>	-	+	-	-	-
<i>M. gallinaceum</i>	-	-	-	+	-
<i>M. iners</i>	-	-	-	+	-
<i>M. pullorum</i>	+	-	-	-	-

## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Il nostro studio dimostra che, seppur con una certa variabilità interspecifica, molte delle specie di micoplasmi aviari studiate sono in grado di produrre biofilm *in vitro*. La capacità di produrre biofilm potrebbe permettere al ceppo di sopravvivere in condizioni avverse sia *in vivo* che su superfici abiotiche. Tale dato apre a possibili ipotesi sulla diffusione dei micoplasmi nell'ambiente, che in alcuni casi sembrerebbe essere particolarmente fuori dagli schemi. Tramite questo lavoro di ricerca siamo riusciti a creare le condizioni *in vitro* affinché i micoplasmi aviari possano produrre biofilm. Inoltre abbiamo messo a punto un metodo efficace per visualizzare otticamente il biofilm, rendendo il sistema applicabile alla routine diagnostica. Sicuramente, studi futuri su larga scala saranno necessari per comprendere meglio le differenze tra i biofilm prodotti dalle varie specie di *Mycoplasma* nonché le capacità acquisite dai micoplasmi stessi in questo stato di "resistenza" nell'ambiente. L'obiettivo finale sarà quello di comprendere il ruolo, verosimilmente cruciale, nella complessa epidemiologia di tali affascinanti microrganismi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cassell GHWA, Clyde J. and Davis JK. (1985) Mycoplasmal respiratory infections. In: Razin S, Barile MF (Eds.), *The Mycoplasmas: Mycoplasma Pathogenicity* Vol. 4, Academic Press, Orlando, FL, pp. 65-106.
2. McAuliffe L. (2010). Secrets of a successful minimalist-safety in numbers. *Microbiologist*. 11: 33-36.
3. Mah TF and O'Toole GA. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends. Microbiol.* 9: 34-39.
4. McAuliffe L, Ellis RJ, Miles K, Ayling RD and Nicholas RA. (2006). Biofilm formation by *mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*. 152: 913-922.



## INDAGINI DIAGNOSTICHE IN EPISODI DI CORIZZA DEL FAGIANO RIPRODUTTORE

Di Castri A.<sup>1</sup>, Cornaggia M.<sup>1</sup>, Viel L.<sup>1</sup>, Losasso C.<sup>2</sup>, Orsini M.<sup>2</sup>, Peruzzo A.<sup>2</sup>, Catania S.<sup>3</sup>, Zanardello C.<sup>4</sup>, Gobbo F.<sup>5</sup>, Bano L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratorio di Diagnostica Clinica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Giuseppe Mazzini, 4, 31020 Villorba (TV), Italia.*

<sup>2</sup> *Laboratorio di Ecologia Microbica e Genomica dei Microrganismi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.*

<sup>3</sup> *Laboratorio di Medicina Aviare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via S. Giacomo, 5, 37135 Verona (VR), Italia.*

<sup>4</sup> *Laboratorio di Istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.*

<sup>5</sup> *Virologia Speciale e Sperimentazione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.*

### Summary

Sinusitis or “bulgy eyes” is one of the most common infectious disease of breeding pheasants. The condition is often associated with the presence of a complex of microorganisms including *Mycoplasma* spp., bacteria and viruses. In this report, we briefly describe the diagnostic remarks of breeding pheasants with sinusitis. In a 2 years period, five groups of birds of the same flock, were sent to the veterinary diagnostic laboratory for post-mortem examination. Some of them were at the onset of the clinical signs, others showed chronic lesions. As expected, we were able to detect a broad variety of different microorganisms including *Mycoplasma* spp. Among the bacteria, we isolated 2 new species that were recurrently present in the infraorbital sinuses of the diseased animals. The analysis of the genomes of the 2 isolates revealed that one belonged to the genus *Campylobacter*, species unknown, whereas the second one resulted completely unclassified at genus and species level. The pathogenic power of these new bacteria species needs to be further investigated in order to clarify their role in this multifactorial disease. Furthermore, the presence of a probably new *Campylobacter* species is worthy of note, especially if isolated from an unusual anatomic district of birds.

### INTRODUZIONE

La corizza infettiva è una malattia acuta respiratoria del pollame, causata da un coccobacillo Gram negativo denominato *Avibacterium paragallinarum*, un tempo noto come *Haemophilus paragallinarum* (Blackall and Soriano, 2008). Essa si presenta più frequentemente nel pollo, ma è stata descritta anche in altre specie come il tacchino, il fagiano, la faraona e la quaglia. (Blackall and Hinz, 2008)

Questa malattia colpisce primariamente le vie aeree superiori ed è caratterizzata da elevata morbilità e scarsa mortalità, ma poiché fortemente debilitante, causa gravi perdite in termini di incrementi ponderali giornalieri e di uova deposte (Blackall and Hinz, 2008).

Condizioni ambientali sfavorevoli e infezioni concomitanti, sostenute da altri bat-

teri (*Mycoplasma spp*, *Pasteurella spp* e *E. Coli*) e/o virus, predispongono a forme più severe e prolungate (Blackall and Hinz, 2008).

Secondo alcuni autori, solo il pollo (*Gallus gallus*) sarebbe sensibile all'infezione sostenuta da *A. paragallinarum*. Nelle specie sopra citate, un gran numero di batteri, di cui molti non ancora classificati e appartenenti alla famiglia *Pasteurellaceae* (Christensen *et al.*, 2009), sarebbe stato isolato da casi di malattia delle vie aeree superiori, ma nessuno di questi si identificherebbe con *A. paragallinarum* (Blackall and Chen, 2015).

Esiste poi un quadro ben noto come “corizza del tacchino”, sostenuto da un batterio completamente diverso, *Bordetella avium* (Jackwood and Saif, 2008). Pertanto, solo studi che si avvalgono di dettagliati approfondimenti di batteriologia o di biologia molecolare, possono realmente escludere o confermare il coinvolgimento di *A. paragallinarum* da specie che non ne costituiscono l'ospite naturale (Blackall and Soriano, 2008).

Il quadro di sinusite o “occhio gonfio” (bulgy eyes) è la manifestazione clinica più importante di malattia delle vie aeree superiori del fagiano (*Phasianus colchicus*), nonché la principale causa infettiva di morte nell'allevamento di questa specie, secondo alcuni autori (Pennycott, 2000; Welchman, 2016), già descritta a partire dal 1958 in UK (Keymer, 1961).

Studi condotti negli anni successivi hanno portato a credere che la sinusite del fagiano sia il risultato di una infezione sostenuta primariamente da Micoplasm, nello specifico da *M. gallisepticum*, e che altri agenti causali infettivi e non, giocherebbero un ruolo importante sulla gravità del quadro clinico osservato (Welchman *et al.*, 2002).

Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare gli agenti infettivi coinvolti in episodi ricorrenti di sinusite, osservati in un allevamento di fagiani allevati a scopo venatorio.

## **MATERIALI E METODI**

### *Anamnesi e campionamento*

Nell'allevamento oggetto di studio, da circa quaranta anni, vengono allevati all'aperto fagiani di razza *Mongolia* a scopo venatorio, per un totale di circa 40.000 soggetti distribuiti su 6 ettari di terreno. Parte dei giovani adulti viene utilizzata come rimonta interna per sostenere il numero di circa 4.000 riproduttori, comprendenti maschi e femmine in rapporto di 1 a 7. I soggetti risultano regolarmente vaccinati per malattia di Newcastle, Vaiolo ed infezioni sostenute da *Pasteurella multocida* e *M. gallisepticum* (6/85). Da qualche anno vengono riportati casi di sinusite nei soggetti giovani a partire da 120-150 giorni di età. Questi casi tendono progressivamente ad aggravarsi, soprattutto nel periodo autunnale, e a cronicizzare nel gruppo dei riproduttori, nonostante i trattamenti con antimicrobici. La sintomatologia è caratterizzata da depressione del sensorio, scolo nasale accompagnato da rari starnuti e difficoltà respiratoria, quando sottoposti a manipolazione.

Dal 2019 al 2020, presso la sezione territoriale di Treviso dell'IZS delle Venezie sono stati conferiti sei gruppi di soggetti dell'allevamento sopra descritto, di età compresa tra i dieci mesi e i due anni, per un totale di 33 fagiani sottoposti ad esame anatomopatologico.

### *Esame batteriologico e ricerca Micoplasmi*

L'esame batteriologico è stato condotto dai seni infraorbitali di 23 soggetti con sinusite di vario grado, e dal sacco aereo di 4 soggetti con aerosacculite fibrinosa. Il materiale patologico prelevato attraverso tampone cotonato, è stato seminato su terreni di coltura, incubati a 37 °C in condizioni di aerobiosi (agar sangue ed eosin methylene blue agar) e microaerofilia (columbia agar con balia, agar cioccolato, brain heart infusion broth con aggiunta di NAD). L'identificazione delle colonie isolate è stata eseguita con metodi standard ed in ultima analisi mediante spettrometria di massa con tecnologia MALDI TOF MS (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics), che permette l'identificazione batterica comparando lo spettro ottenuto da proteine fingerprint del ceppo in esame con quelli di ceppi noti presenti nel database collegato allo strumento. Qualora l'identificazione attraverso spettrometria di massa risultasse non attendibile a causa di una incompleta sovrapposizione tra i due tracciati spettrofotometrici o per assenza dello spettro corrispondente nel database, il ceppo veniva sottoposto ad ulteriori approfondimenti biochimici e biomolecolari. Questi ultimi si sono basati sul sequenziamento dell'intero genoma e assemblaggio con approccio De Novo (Cole et al., 2014). Per l'identificazione di specie le singole sequenze sono state confrontate con la banca dati NCBI per il gene rDNA 16S.

Da 14 dei 23 soggetti sottoposti ad esame batteriologico, è stata eseguita la ricerca in PCR di *M. gallisepticum* e *M. synoviae* su tampone prelevato da seno infraorbitale. Da altri 5 degli stessi 23 soggetti, appartenenti tutti all'ultimo gruppo di conferimento, la ricerca in PCR è stata invece eseguita su tampone endotracheale. Tale indagine è stata condotta in pool di tamponi per ciascun gruppo di conferimento. Inoltre, da alcuni soggetti di ciascun gruppo è stato condotto l'esame colturale specifico per *Mycoplasma* spp. a partire da essudato patologico prelevato sterilmente dai seni infraorbitali (Catania et al., 2019).

### *Ulteriori accertamenti diagnostici*

In tre dei sei gruppi è stata eseguita la ricerca di Metapneumovirus aviare (APV) attraverso RT-Real time PCR su pool di tamponi tracheali in due gruppi, e su pool di tamponi prelevati dai seni infraorbitali nel terzo (Guionie et al., 2007). Sono stati prelevati 3 pool di polmoni, da tre dei sei gruppi conferiti, da sottoporre a RT-Real time PCR per ricerca del Virus della Bronchite infettiva aviare (IBV) (Callison et al., 2006).

Una porzione di tessuto della parete del seno infraorbitale con annesso essudato caseoso infiammatorio è stata sottoposta ad esame istologico e ad esame virologico ad ampio spettro condotto tramite microscopia elettronica (Robards et al., 1998).

Negli ultimi due gruppi conferiti sono stati prelevati campioni di emosiero da sottoporre alla ricerca di anticorpi nei confronti di *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, mediante tecnica ELISA (IDEX test kit), impiegando kit commerciali non validati su siero di fagiano. Nell'ultimo gruppo inoltre i campioni di emosiero sono stati anche sottoposti alla ricerca di anticorpi per IBV (IDEX test kit).

In tutti i soggetti è stato eseguito un esame parassitologico a fresco attraverso osservazione microscopica di contenuto intestinale prelevato dal tratto prossimale dell'intestino e dal cieco. Eventuali ectoparassiti rilevati sulla cute dei soggetti, sono stati sottoposti ad identificazione tassonomica eseguita su base morfologica.

## RISULTATI

All'esame anatomopatologico si osservava congiuntivite sierosa e sinusite accompagnata da severa tumefazione mono o bilaterale dei seni infraorbitali, conseguente ad accumulo di abbondante essudato d'aspetto variabile da mucoso a caseoso, a seconda del grado di cronicità della malattia. Infatti l'essudato, tendeva a perdere la componente liquida divenendo sempre più compatto con il progredire della malattia. Alcuni di questi soggetti presentavano anche lesioni a carico dei sacchi aerei, da lievi (opacizzazione dei sacchi aerei) a gravi (aerosacculite fibrinosa). Risultava inoltre costante il rinvenimento di un'importante infestazione da parassiti sia interni che esterni.

L'esame batteriologico condotto a partire dal seno infraorbitale dei 23 soggetti ha portato all'isolamento di molteplici specie batteriche, di seguito elencate in ordine di frequenza decrescente (tra parentesi è riportato il numero dei soggetti da cui sono state isolate): *E. coli* (14), *P. multocida* (9), *Pasteurella/Haemophilus spp* (8), *O. rhinotracheale* (7), *Campylobacter spp.* (4), *Trueperella pyogenes* (1) (tabella 1). Solo un seno infraorbitale, appartenente ad un soggetto dell'ultimo gruppo è risultato negativo all'esame batteriologico. Dai sacchi aerei di due soggetti dello stesso gruppo è stato invece isolato *Gallibacterium anatis* mentre gli altri 2 sono risultati negativi. Le colonie cui ci si riferisce come *Pasteurella/Haemophilus spp.* e *Campylobacter spp.* sono state sottoposte ad una identificazione che si è avvalsa in prima istanza di metodi di batteriologia classica. Il primo isolato era un cocco-bacillo, Gram-negativo, microaerofilo, NAD-indipendente, catalasi positivo, con ossidasi dubbia, indolo negativo, ureasi negativo, non cresciuto su terreno selettivo per enterobatteriaceae (McConkey). L'appartenenza al genere *Avibacterium spp.* di tale specie microbica è stata esclusa sulla base dei risultati di fermentazione di un panel di zuccheri (positività a 24 ore per saccarosio, a 48 ore per lattosio e maltosio, negatività per glucosio, mannitolo, sorbitolo, arabinosio, trealosio, ramnosio, amilosio, melibiosio e inositolo). La colonia è inoltre risultata positiva a 48 ore all'esculina e negativa ai seguenti test biochimici: produzione di H<sub>2</sub>S, liquefazione della gelatina (GEL), produzione di β-galattosidasi batterica (ONPG), produzione di arginina deidrolasi (ADH), produzione di lisina decarbossilasi (LDC), produzione di ornitina decarbossilasi (ODC), produzione di triptofano deaminasi (TDA), utilizzo del citrato come unica fonte di carbonio (CIT), test di Voges-Proskauer per evidenziare la produzione di acetoina durante la fermentazione, riduzione di nitrati in nitriti (NO<sub>3</sub>), produzione di β-glucuronidasi (PNPG).

Il secondo ceppo era un bacillo Gram negativo, ricurvo (a virgola), emolitico e catalasi positivo. Essendo una specie batterica a lenta crescita (48 – 72 ore) e particolarmente esigente (necessita di strette condizioni di microaerofilia e di terreni ricchi), si è deciso di non testarne le caratteristiche biochimiche e di sottoporlo a identificazione genetica.

Il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) delle 2 specie batteriche, ha permesso di giungere ad una classificazione attendibile a livello di famiglia parziale nel primo caso, e certa di genere per il secondo isolato (*Campylobacter spp.*).

La ricerca di *M. gallisepticum* e *M. synoviae* da seno infraorbitale attraverso PCR ha sempre dato esito negativo. Solo nell'ultimo gruppo di conferimento si riscontra una positività per *M. gallisepticum* da pool di trachee. L'esame colturale per *Mycoplasma spp.* ha portato all'isolamento di varie specie, indicate di seguito in ordine

decescente di frequenza (tra parentesi il numero di soggetti): *M. verecundum* (4), *M. iowae* (3), *M. gallinaceum* (3), *M. iners* (2), *M. pullorum* (1) e *M. glycyphilum* (1) (tabella 1). Per l'ultimo gruppo di conferimento l'esame colturale risulta ancora in corso.

La ricerca di agenti virali, IBV e APV, attraverso RT-Real time PCR da pool di polmoni e da tamponi prelevati da seni infraorbitali/trachee, rispettivamente, ha portato, a sua volta, ad esito negativo. Anche la microscopia elettronica, per la ricerca di particelle virali, su una porzione di tessuto patologico è risultata negativa.

L'istologia della medesima porzione di tessuto ha rivelato un gravissimo ed esteso processo di infiammazione fibrino-necrotico-eterofilo batterica con edema e congestione.

La ricerca sierologica sul penultimo gruppo di fagiani ha svelato una omogenea negatività per *M. synoviae* e positività per *M. gallisepticum* nel 50% dei soggetti. L'ultimo gruppo è invece risultato omogeneamente negativo per *M. synoviae* e *M. gallisepticum*, ma in 4 soggetti su 5 si è riscontrata positività agli anticorpi per IBV. In 14 soggetti è stato possibile osservare la presenza di uova di ascaridi tra cui *Capillaria spp.* ed *Heterakis spp.*, spesso compresenti, e in due di questi soggetti anche di oocisti di coccidi. Gli ectoparassiti, rinvenuti su tutti i soggetti esaminati, sono stati invece classificati in parte come *Lipeurus caponis* e in parte come appartenenti alla famiglia *Analgidae*.

## DISCUSSIONE

La sinusite è una delle più comuni malattie che si riscontrano nell'allevamento del fagiano riproduttore (Forrester *et al.*, 2011; Pennycott, 2011). Gli animali presentano congiuntivite e lacrimazione, perdita del piumaggio nella regione periorbitale, grave edema bilaterale dei seni infraorbitali con contenuto catarrale o eosinofilo che si diffonde attraverso la fessura palatina all'interno del cavo orale (Pennycott, 2000; Forrester *et al.*, 2011). Può anche esserci, più raramente, un coinvolgimento delle vie aeree inferiori con tracheite, lesioni polmonari, aerosacculite e dispnea (Pennycott, 2000; Bradbury *et al.*, 2001). Gli animali manifestano inoltre depressione del sensorio, ridotta assunzione di alimento e acqua di bevanda, calo dell'ovo-deposizione e ridotto accrescimento corporeo (Blackall and Soriano, 2008). La terapia con antimicrobici spesso risulta inutile e la morte sopraggiunge per inanizione.

Il primo a individuare un possibile agente infettivo causale fu Keymer, i cui studi, già cominciati nel 1958, portarono all'isolamento di batteri del genere *Mycoplasma spp.* dalle lesioni (Keymer, 1961).

Supportati da riscontri in diversi paesi tra cui Australia (Reece *et al.*, 1986), Regno Unito (Lister 1989; Bradbury *et al.*, 2001) e Stati Uniti (Cookson and Shivaprasad, 1994), molti autori indicarono *M. gallisepticum* come agente eziologico primario di questa forma clinica del fagiano.

Nel caso oggetto di questo studio, contrariamente a quanto più diffusamente risulta riportato in bibliografia, le ricerche volte a dimostrare la presenza di *M. gallisepticum* all'interno delle lesioni, seppur da un numero significativo di soggetti, non ha portato ad esito favorevole. Sia la PCR sia l'isolamento a partire da materiale prelevato dai seni infraorbitali di soggetti a vari stadi della malattia, hanno dato riscontro negativo. Bradbury *et al.* (2001) ricordano come *M. gallisepticum* non risulti facilmente isolabile in coltura, anche da animali positivi in PCR, in quanto spesso

coperto da altri Micoplasmia a crescita veloce che svolgono molto probabilmente solo un ruolo di commensali. L'uso di un terreno di trasporto e il mantenimento della catena del freddo risulterebbero quindi essenziali. D'altro canto alcuni autori riferiscono come si possa avere più successo eseguendo la PCR per *M. gallisepticum* a partire da tampone endotracheale, aumentando considerevolmente la possibilità di trovare il patogeno (Welchman et al., 2002). L'ultimo gruppo, in cui si evidenziavano lesioni in fase acuta di malattia e non recentemente vaccinati, è risultato positivo alla ricerca di *M. gallisepticum* tramite PCR da tampone endotracheale eseguito in pool e solo l'esito del colturale, ancora in corso, ci permetterà di escludere o confermare la presenza di questo microorganismo all'interno dei seni infraorbitali e di correlarlo specificatamente alla patogenesi della malattia, tenendo comunque conto delle difficoltà definite sopra.

Bradbury et al. (2001) hanno riportato una vasta gamma di altri Micoplasmia (*M. glycyphilum*, *M. pullorum*, *M. gallinaceum*, *M. iners*) da casi di sinusite del fagiano e della pernice, mettendo in dubbio il loro ruolo patogeno. Non è inusuale isolare anche 3 o 4 diverse specie di Micoplasmia da un singolo sito di prelievo (occhio, seno infra-orbitale, trachea) di un medesimo soggetto. Tutte queste specie, con l'aggiunta di *M. verecundum* e *M. iowae* sono state isolate nel caso qui discusso. Il ruolo patogeno di tutti questi Micoplasmia sarebbe stato tuttavia messo in discussione nella selvaggina (Bradbury et al., 2001), fatta eccezione che per *M. iowae* (Catania et al., 2014), in questo caso isolato da 3 soggetti, tutti appartenenti allo stesso gruppo. In nessun caso è stato possibile invece isolare *M. synoviae*, in linea con quanto riportato in bibliografia (Bradbury et al., 2011)

Infezioni miste sono molto frequenti nella selvaggina e spesso coinvolgono *M. gallisepticum* e agenti virali come *Metapneumovirus aviare* (APV) e *Virus della Bronchite infettiva* (IBV) che possono agire in sinergia ed esacerbare il quadro clinico, come avviene nel pollo. Forme ancora più severe possono sopraggiungere conseguentemente ad infezioni batteriche secondarie sostenute in particolare da *E. coli*, *P. multocida* e *O. rhinotracheale* (Welchman et al., 2013). Per quanto non ci sia stato possibile individuare la presenza di agenti virali, la nostra ricerca non si è avvalsa dell'opportunità di cercare gli anticorpi nel siero dei soggetti nei confronti di APV, cosa che gli autori incoraggiano vivamente: la positività anticorpale sarebbe infatti più frequentemente associata alla sinusite rispetto alla presenza del virus, proprio in virtù del ruolo di questo virus come precursore di malattia. Lo stesso discorso si potrebbe fare per IBV, ma attualmente non sembrano esserci test ELISA validati per questa specie (Welchman et al., 2002). La positività agli anticorpi per IBV riscontrata nell'ultimo gruppo di soggetti andrebbe pertanto interpretata con cautela.

Da tutti i soggetti esaminati è stata isolata una grande varietà di batteri, spesso anche due o tre specie batteriche diverse dallo stesso sito (seno infraorbitale) del medesimo soggetto. La specie più frequentemente isolata è stata *E. coli*, più spesso associata a *P. multocida*, in 6 soggetti, seguita da *ORT*, in 5 soggetti e da *Pasteurella/Haemophilus spp.* in 4 soggetti. Due soggetti vedevano la compresenza di *E. coli*, *ORT* e *P. multocida* o *Pasteurella/Haemophilus spp.* In altri due soggetti è stata invece riscontrata l'associazione di *Pasteurella/Haemophilus spp.* e *Campylobacter spp.*

Una serie di test biochimici ci ha permesso di escludere che il batterio indicato come *Pasteurella/Haemophilus spp.* appartenesse alla famiglia *Avibacterium*.

La sua caratterizzazione, così come quella dell'isolato appartenente alla famiglia

*Campylobacter*; non è ancora completa e necessita ulteriori approfondimenti, ma ci sarebbero buone probabilità che possa trattarsi di due specie batteriche nuove vista la mancata relazione di identità con il profilo genetico e biochimico di altri batteri noti. Non si può escludere che possano avere avuto un ruolo chiave nella patogenesi della malattia, soprattutto perché isolate da soggetti, in assenza di altri patogeni ritenuti primari. Per quanto meno frequente, sono infatti stati riportati in letteratura casi di sinusite nel fagiano sostenuti primariamente da batteri, in assenza di *M. gallisepticum* e agenti virali (Chin and Goshgarian, 2001).

L'isolamento di specie nuove appartenenti alla famiglia *Pasteurellaceae* da forme respiratorie non è infrequente nel pollame in generale, e nel fagiano in particolare (Christensen *et al.*, 2003). In molti uccelli le specie microbiche appartenenti al genere *Campylobacter* sono considerate commensali intestinali (es. *C. lari*, *C. jejuni*, *C. coli*), anche se nel pollo alcuni ceppi si sono dimostrati in grado di localizzarsi a livello extra-intestinale (*C. jejuni*, *C. coli*), mentre altre sono state associate a patologie specifiche di questa specie animale, quali la spotty liver disease (*C. hepaticus*) (Markey *et al.*, 2013; Crawshaw *et al.*, 2015; Van *et al.*, 2016). Localizzazioni di *Campylobacter ssp.* a livello di seni infraorbitali non sono mai state segnalate prima della presente comunicazione e il loro possibile ruolo nelle forme di sinusite del fagiano dovrà essere approfondito con studi di patogenesi. Ulteriori approfondimenti saranno condotti per giungere innanzitutto ad una identificazione della specie isolata, e non è escluso che possa trattarsi di una specie di *Campylobacter* non ancora segnalata.

In ultima analisi bisogna prendere in considerazione come il quadro respiratorio sostenuto da più agenti infettivi possa essere ulteriormente complicato dalla presenza di parassiti interni ed esterni, come in questo caso specifico, e come pertanto il trattamento di queste infezioni/infestazioni miste possa essere davvero problematico, soprattutto al sopraggiungere delle basse temperature autunnali e invernali, in un sistema d'allevamento all'aperto (Pennycott, 2001).

L'assenza di presidi immunizzanti specifici e di comprovata efficacia in questa specie, l'assenza di misure terapeutiche che possano eliminare le infezioni dall'allevamento (Pennycott, 2001; Welchman, 2016) e la pleora di patogeni coinvolti contemporaneamente fanno riflettere su come si possa agire, ponendo l'accento sulla necessità di attuare altre strategie: ridurre le fonti di stress garantendo spazi adeguati e riducendo al minimo le manipolazioni degli animali; migliorare le condizioni igienico – sanitarie, riducendo la carica microbica ambientale e attuando programmi “tutto pieno/tutto vuoto”; controllare le infestazioni da endo- ed ecto-parassiti e agendo a monte del problema, migliorando i livelli di biosicurezza dell'allevamento (Pennycott, 2001).

## CONCLUSIONI

Il presente studio conferma la complessità eziologica della sinusite del fagiano ed evidenzia il coinvolgimento di specie batteriche non note, confermate sia da studi biochimici che di genotipizzazione accurata quali il WGS. Una volta identificate chiaramente, il ruolo di queste nuove specie batteriche dovrà essere approfondito con studi di patogenesi. Allo stesso modo, si provvederà ad eseguire più approfondite indagini volte ad valutare il coinvolgimento pregresso di *M. gallisepticum*, APV e IBV.

**Tabella 1.** Numero di soggetti positivi alla singola specie/ famiglia batterica, divisi per organo e per gruppo di conferimento.

Specie/Famiglia batterica	Organo	Gruppo						Tot
		I (4 soggetti)	II (4 soggetti)	III (3 soggetti)	IV (3 soggetti)	V (4 soggetti)	VI (5 soggetti)	
	Seno infraorbitale	N° di soggetti positivi						
<i>E. coli</i>		4	4	2	3		1	14
<i>P. multocida</i>		2	4	1			2	9
<i>Pasteurella/ Haemophilus spp.</i>					3	4	1	8
<i>O. rhinotracheale</i>		3		1	1		2	7
<i>Campylobacter spp.</i>					1	2	1	4
<i>T. pyogenes</i>				1				1
<i>M. verecundum</i>			1	3				4
<i>M. iowae</i>					3			3
<i>M. gallinaceum</i>				3				3
<i>M. iners</i>			1			1		2
<i>M. pullorum</i>						1		1
<i>M. glycyphylum</i>						1		1
	Sacco aereo							
<i>G. anatis</i>						2		2

## BIBLIOGRAFIA

1. Blackall PJ, Hinz KH. (2008). Infectious Coryza and related diseases. Poultry Diseases, 6<sup>th</sup> edition, Chapter 11, pp. 155- 159.
2. Blackall PJ, Soriano EV. (2008). Infectious Coryza and related bacterial infections. Diseases of poultry, 12<sup>th</sup> edition, Chapter 20, pp.789-803.
3. Blackall PJ, Chen X. (2015). Infectious Coryza and related diseases. Manual of poultry diseases, Chapter 47, pp. 327-331.
4. Bradbury JM, Yavari CA, Dare CM. (2001). Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges. Avian Pathology, Volume 30, Issue 4.
5. Callison S A, Hilt D A, Boyton T O, Sample B F, Robison R, Swayne D E, Jackwood M W (2006). Development and evaluation of a real time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens Journal of Virological Methods.138, 60-65.
6. Catania S, Gobbo F, Rodio S, Fincato A, Qualtieri K, Santone C, Nicholas RAJ. (2014). First Isolation of Mycoplasma iowae in Grey Partridge Flocks. Avian Diseases 58(2):323-325.
7. Catania S, Bottinelli M, Fincato A, Gastaldelli M, Barberio A, Gobbo F, Vicenzoni G. Evaluation of Minimum Inhibitory Concentrations for 154 Mycoplasma synoviae isolates from Italy collected during 2012-2017. PLoS One. 2019 Nov 7; 14 (11):e0224903.

8. Chin RP, Goshgarian M. (2001). Infraorbital sinusitis associated with *Pasteurella multocida* in pen-raised ring-necked pheasants. *Avian Diseases* 45:540-543.
9. Christensen H, Blackall PJ, Bisgaard M. (2009). Phylogenetic relationships of unclassified, satellitic Pasteurellaceae obtained from different species of birds as demonstrated by 16S rRNA gene sequence comparison. *Research in Microbiology*, Volume 160, Issue 5, June 2009, pp. 315-321.
10. Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42 (Database issue): D633-D642.
11. Cookson KC and Shivaprasad HL. (1994). *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants and peafowl. *Avian Diseases* 39, 914-931.
12. Crawshaw T & Young S. (2003). Increased mortality on a free-range layer site. In *The Veterinary record* (Vol. 153, Issue 21, p. 664).
13. Forrester CA, Bradbury JM, Dare MC, Domangue RJ, Windsor H, Tasker JB, Mockett APA. (2011). *Mycoplasma gallisepticum* in pheasants and the efficacy of tylvalosin to treat the disease. *Avian Pathology*, Volume 40, Issue 6.
14. Guionie O, Toquin D, Sellal E, Bouley S, Zwingelstein F, Allée C, Bougeard S, Lemièrre S, Etteradossi N (2007). Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. *J. Virol. Methods.* 139:150-158.
15. Jackwood MW, Saif YM. (2008). Bordetellosis (Turkey Coryza). *Diseases of poultry*, 12th edition, Chapter 19, pp. 774-788.
16. Keymer IF. (1961). Infectious sinusitis of pheasants and partridges. *Veterinary Record* 73, pp. 1034-1038.
17. Lister SA. (1989). Diseases of gamebirds. In *Practice* 11, 170-174.
18. Markey B, Finola L, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. (2013). *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* species. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2th edition, Chapter 24, pp. 335- 343.
19. Pennycott TW. (2000). Causes of mortality and culling in adult pheasants. *The Veterinary record* 146 (10):273-8
20. Pennycott TW. (2001). Disease control in adult pheasants. In *Practice*, 2001; 23:132-140.
21. Reece RL, Ireland L, Barr DA. (1986). Infectious sinusitis associated with *Mycoplasma gallisepticum* in gamebirds (quail, partridge, pheasant). *Australian Veterinary Journal* 63, 163-168.
22. Robards A W, Wilson A J. (1998). *Procedures in Electron Microscopy*. Centre for Cell & Tissue Research, University of York, UK Wiley.
23. Van T T H, Elshagmani, E, Gor M C, Scott P C, & Moore R J (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4518–4524.
24. Welchman DdeB, Bradbury JM., Cavanagh D, Aebischer NJ. (2002). Infectious agents associated with respiratory disease in pheasants. *The Veterinary record* 150, 658-66.
25. Welchman DdeB. (2016). Diseases in gamebirds: an update. 38 , 189-192.



## ATTIVITÀ ANTICOCCIDICA IN VITRO DI ESTRATTI VEGETALI

Felici M.<sup>1</sup>, Tugnoli B.<sup>2</sup>, Ghiselli F.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>3</sup>, Tosi G.<sup>3</sup>, Fiorentini L.<sup>3</sup>, Piva A.<sup>1,2</sup>, Grilli E.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;

<sup>2</sup> Vetagro S.p.A., via Porro, 2 – 42124 – Reggio Emilia (Italia);

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede territoriale di Forlì, Forlì (FC), Italia;

<sup>4</sup> Vetagro, Inc., 230 S. Clark St., # 320, 60604 Chicago (IL), USA;

### Summary

The anticoccidial activity of thymol, carvacrol, saponins and garlic oil was assessed in an in vitro model of coccidiosis. *Eimeria* spp. sporozoites were collected from field samples, characterized and used for 3 different invasion assays on Madin-Darby Bovine Kidney cells (MDBK). The cells were challenged with  $5 \times 10^4$  sporozoites without (control) or with various treatments: saponins (10 ppm), thymol and carvacrol (7 ppm each), a combination of saponins, thymol, and carvacrol at 2 doses; MIX 1 (saponins 5 ppm, thymol 3.5 ppm and carvacrol 3.5 ppm), MIX 2 (saponins 10 ppm, thymol 7 ppm and carvacrol 7 ppm). Garlic oil was tested at two concentrations: 10 ppm and 100 ppm. The treated cells were incubated at 37°C for 24 hours (invasion assay 1 and 3) and for 2, 24, and 48 hours (invasion assay 2). The efficiency of invasion was determined by counting the sporozoites left in the supernatant that were not able to invade the cells, while intracellular *Eimeria* DNA was detected by qPCR to confirm the data. Data were analyzed with ANOVA and differences were considered significant when p-value was  $\leq 0.05$ . Data from invasion assay 1 showed that the thymol and carvacrol-containing blends significantly reduced invasion, especially in combination with saponins at the highest dose. Saponins alone did not have a strong inhibiting activity but acted synergistically with the other molecules. Interestingly, in invasion assay 2 it was found that the effect of the highest dose of the blend of saponins, thymol and carvacrol was already visible at 2 hours post infection, while the other treatments were significantly successful at 24 hours post infection. Data from invasion assay 3 proved the inhibiting power of garlic oil at the lowest dose, while the highest one was cytotoxic for MDBK cells too. The invasion assay protocol was designed to screen molecules *in vitro* starting from field fecal samples and it can represent a potential tool in *Eimeria* research. Moreover, this study shows that invasion in MDBK cells by *Eimeria* sporozoites is inhibited in presence of thymol, carvacrol, saponins and garlic oil, thus highlighting the anticoccidial potential of these compounds.

### INTRODUZIONE

I coccidi del genere *Eimeria* sono importanti parassiti aviari che causano gravi enteriti, con conseguenti perdite economiche nel settore avicolo, stimate a oltre 3 miliardi di dollari all'anno (Cobaxin-Cardenas, 2018). Le specie di *Eimeria* principalmente coinvolte nell'insorgenza della malattia sono cinque: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix* ed *E. tenella*, con le ultime tre associate al più alto tasso di

mortalità e maggior parte dei sintomi, mentre le altre comportano manifestazioni subcliniche, che sono spesso più difficili da riconoscere (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015). Inoltre, i coccidi possono contribuire all'insorgenza di infezioni secondarie, come la clostridiosi, fattore scatenante di gravi enteriti necrotiche (Moore, 2016). Le strategie di controllo della malattia includono l'uso di ionofori e farmaci anticoccidici sintetici applicati con programmi di rotazione o vaccinazione con oocisti di *Eimeria* vive. Tuttavia, i vaccini possono innescare reazioni indesiderate che influenzano le prestazioni di crescita e soprattutto, di recente, sono stati documentati molti casi di resistenza ai farmaci anticoccidici (Abbas, Colwell, & Gilleard, 2012). Di conseguenza, la ricerca si sta ora concentrando sullo studio di nuove alternative per controllare questi agenti patogeni (Peek H.W., 2011). I prodotti di origine botanica sono ben noti per la loro attività antimicrobica e antiparassitaria, quindi possono rappresentare uno strumento prezioso contro *Eimeria* (Cobaxin-Cardenas, 2018). I meccanismi di azione antimicrobico di queste molecole comprendono la degradazione della parete cellulare, il danneggiamento del citoplasma, la perdita di ioni con riduzione del gradiente protonico e anche l'induzione dello stress ossidativo, che portano all'inibizione dell'invasione e dello sviluppo intracellulare delle specie di *Eimeria* (Abbas et al., 2012; Nazzaro, Fratianni, de Martino, & Coppola, 2013). Questi composti sono spesso testati *in vivo*, ma le problematiche etiche per il benessere degli animali e gli alti costi di sperimentazione stanno spingendo verso lo sviluppo di nuovi metodi *in vitro* per test di screening (Singh et al., 2016). Tra i composti di origine botanica, timolo, carvacolo e le saponine sono molecole promettenti perché possono interferire con la permeabilità della membrana dei patogeni, causando una cascata di reazioni che coinvolgono l'intera cellula causandone la morte (Nazzaro et al., 2013). Questi composti si trovano naturalmente in diverse piante: timolo e carvacolo sono i principali componenti di origano, timo e basilico (Sakkas & Papadopoulou, 2017), mentre le specie del genere *Quillaja* e *Yucca* sono fonti comuni di saponine, glicosidi anfipatici con funzione di difesa (Francis, Kerem, Makkar, & Becker, 2002). Anche l'aglio e il suo olio essenziale sono da tempo noti come potenti composti antimicrobici, antiparassitari e antiinfiammatori, e di recente ne sono stati anche documentati effetti benefici sul benessere animale in seguito a challenge *in vivo* con oocisti di *Eimeria* (Ali, Chand, Ullah Khan, Naz, & Gul, 2019). Lo scopo di questo studio è valutare l'effetto antiparassitario di diverse miscele di timolo, carvacolo, saponine e olio di aglio sull'efficienza di infestazione degli sporozoitidi di *Eimeria* *in vitro*. Il protocollo è stato messo a punto in modo da testare presunti composti anticoccidici su campioni di campo, rispettando così il benessere degli animali e evitando il loro sacrificio, come descritto dalle linee guida delle "3Rs" (Russel, W.M.S and Burch, 1959).

## **MATERIALI E METODI**

### *Recupero di sporozoitidi da campioni di campo*

Le oocisti di *Eimeria* spp. sono state raccolte da campioni fecali di animali non vaccinati e sintomatici. I campioni sono stati processati come indicato in "Guidelines on techniques in coccidiosis research" (Shirley, 1995), con alcune modifiche. Le oocisti sono state risospese in bicromato di potassio al 2% (Cat. # P5271, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), per consentire la sporulazione. I campioni sono stati quindi puliti con Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) (Cat. # D8537, Sigma-Aldri-

ch, St. Louis, Missouri, USA) e risospesi in buffer di lisi T1 (Cat. # 740952.240C, MACHEREY-NAGEL Inc., Betlemme, USA) e conservati a -80 ° C fino all'analisi qPCR, eseguita come descritto di seguito. Dopo la sporulazione, le oocisti sono state lavate e risospese in ipoclorito di sodio per la sterilizzazione, quindi sono state nuovamente lavate e lisate con biglie di vetro (0,5 mm) per 1 minuto con Disruptor Genie (Cat. # SI-D258, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) per liberare le sporocisti. In seguito, queste sono state lavate e risospese in terreno di excistazione, contenente 2,5 g/L di tripsina (N. cat. T4049, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 5 g/L di sali biliari (Cat. # B3301, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 2 g/L pancreatina (Cat. # P1750, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e 2 g/L MgCl<sub>2</sub> (Cat. # 459337, Carlo Erba Reagents, Milano, Italia). La sospensione è stata incubata per 90 minuti a 39 ° C. Successivamente, gli sporozoitii ottenuti sono stati lavati e risospesi nel mezzo cellulare per iniziare il test di infestazione.

### *Colture cellulari*

Cellule Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK, Cat. # CCL-22, ATCC, Manassas, Virginia, USA) sono state seminate (1 x 10<sup>5</sup> cellule / pozzetto) su piastre da 24 pozzetti (Cat. # 353047, Corning Incorporated, Corning, New York, USA) e cresciute fino a confluenza per 48 ore in terreno Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (N. cat. D1145, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), siero fetale bovino (FBS) al 10% (N. cat. F7524, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 1x Penicillina-Streptomicina (Cat. # P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e L-glutammina 10 mM (Cat. # G7513, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Le cellule sono state incubate a 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% aria.

### *Saggio di infestazione I*

Una volta a confluenza, le cellule sono state infettate con 5 x 10<sup>4</sup> sporozoitii per pozzetto e trattate con uno dei trattamenti a base di timolo (Cat. # T0501, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), carvacrolo (Cat. # W224511, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e saponine (Vetagro S.p.A., Reggio Emilia, Italia). I gruppi di trattamento erano: controllo negativo (senza sporozoitii e nessun trattamento), controllo infetto (C +), saponine 10 ppm (SAP), timolo e carvacrolo (7 ppm ciascuno) (THY: CAR), saponine 5 ppm + timolo 3.5 ppm + carvacrolo 3,5 ppm (MIX1) o saponine 10 ppm + timolo 7 ppm + carvacrolo 7 ppm (MIX2). L'efficacia dei trattamenti è stata studiata 24 ore dopo l'infezione (hpi). Dopo il test di infestazione, le cellule sono state colorate con tecnica Giemsa al fine di osservare l'effettiva internalizzazione degli sporozoitii trattati. Inoltre, le cellule sono state accuratamente lavate con DPBS fino alla rimozione della maggior parte dei detriti residui. Quindi le cellule sono state staccate con tripsina allo 0,25%, lavate con DPBS, risospese nel buffer di lisi T1 e conservate a -80 ° C fino all'analisi. Per misurare l'efficienza dell'infestazione, gli sporozoitii rimasti nel surnatante di 18 pozzi per gruppo (n = 18) sono stati contati su 4 quadrati di una camera di Burker al microscopio invertito (Nikon Eclipse TS100, Nikon corporation, Tokyo, Japan) e il numero risultante è stato usato per stimare l'efficienza di invasione con la seguente formula:

$$100 - \left[ \left( \frac{\text{numero di sporozoitii nel surnatante dopo il trattamento}}{\text{numero di sporozoitii iniziali}} \right) \times 100 \right]$$

### *Saggio di infestazione 2*

Una volta a confluenza, le cellule sono state infettate con  $5 \times 10^4$  sporozoi per pozzetto e trattate con uno dei trattamenti descritti nel saggio precedente. L'efficienza di infestazione è stata stimata tramite conte degli sporozoi nel surnatante di 12 pozzetti per trattamento ( $n=12$ ) a tre timepoints (2 hpi, 24 hpi e 48 hpi).

### *Saggio di infestazione 3*

Una volta a confluenza, le cellule sono state infettate con  $5 \times 10^4$  sporozoi per pozzetto e trattate con diverse concentrazioni di olio di aglio. I gruppi trattamento erano: controllo negativo (senza sporozoi e nessun trattamento), controllo infetto (C +), olio di aglio 10 ppm (GO10) e olio di aglio 100 ppm (GO100). L'efficienza di infestazione è stata stimata tramite conte degli sporozoi nel surnatante dopo 24 hpi di 6 pozzetti per trattamento ( $n=6$ ).

### *Estrazione del DNA e qPCR*

L'estrazione del DNA e la qPCR sono state eseguite per caratterizzare i campioni di oocisti e per rilevare il DNA di *Eimeria* spp. nelle cellule raccolte dopo i saggi. Il kit di estrazione del DNA NucleoSpin (Cat. N. 740952.240C, MACHEREY-NA-GEL Inc., Bethlehem, USA) è stato utilizzato seguendo le istruzioni del produttore. La concentrazione del DNA è stata misurata usando un Denovix DS-11 Series Spectrophotometer/Fluorometer (modalità microvolume con tecnologia Smart Path - Cat. # DS11, Denovix, Hanby Building, Wilmington, USA) a 260 nm e la qualità è stata verificata con il rapporto 260/280. La reazione di PCR è stata preparata in un volume finale di 10  $\mu$ L, inclusi 5  $\mu$ L di iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Cat. # 1725120, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), 500 nM di primer forward e reverse e 2  $\mu$ L di DNA e la mix è stata analizzata con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Cat. n. 1855195, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). I primer utilizzati per rilevare *Eimeria* spp. sono stati forniti da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e sono stati disegnati in modo da amplificare la regione specie-specifica ITS-1. Il ciclo di reazione utilizzato comprende 3 minuti a 95° C, 40 cicli di 10 secondi a 95° C e 30 secondi a 60° C. La formazione di prodotti non specifici è stata monitorata con un'analisi della temperatura di melting. Il ciclo di melting includeva incrementi di 0,5° C da 55 a 95° C per 5 secondi. Un metodo di quantificazione relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) è stato usato per verificare l'efficacia dell'infestazione, usando come reference il gene del citocromo B bovino (CYTB) (Livak & Schmittgen, 2001).

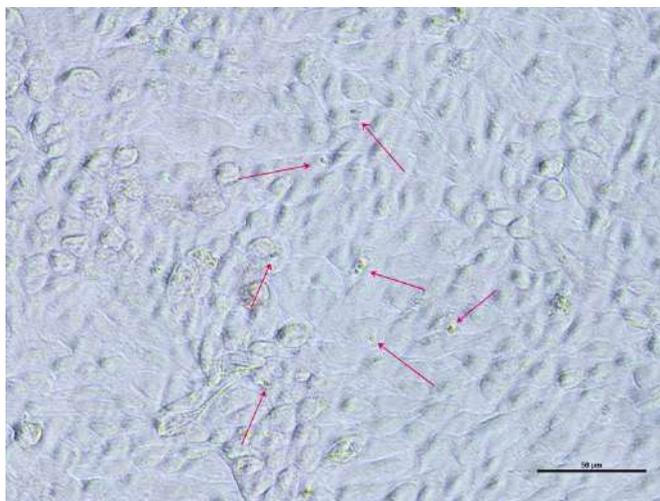
### *Analisi statistica*

Il software Graphpad Prism 8.1.1 è stato utilizzato per eseguire analisi statistiche. È stata effettuata un'analisi descrittiva dei dati e la normalità è stata verificata con il test di Shapiro-Wilk. I dati normalmente distribuiti sono stati analizzati con un test parametrico one-way ANOVA o test T di Student, mentre i dati non normalmente distribuiti sono stati analizzati con i test di Kruskal Wallis. Per il saggio di infestazione a timepoints, il confronto è stato effettuato con un two-way ANOVA. Il post-hoc multiple comparison è stato effettuato con il test di Tukey e le differenze sono state considerate significative quando il valore  $p$  era  $\leq 0,05$ .

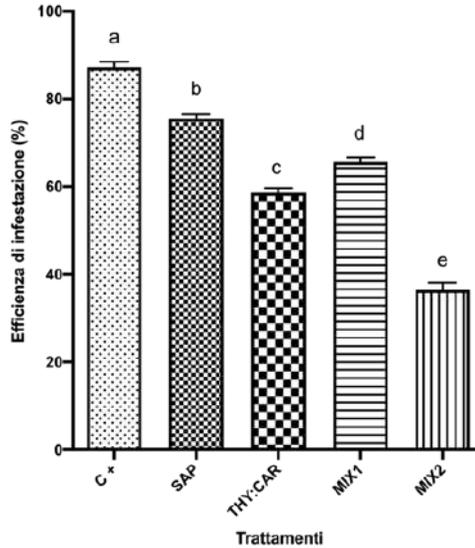
## RISULTATI

I campioni di campo sono stati caratterizzati con qPCR per rilevare le specie di *Eimeria* all'interno. Sono state rilevate le specie *E. tenella*, *brunetti* e *acervulina*. Quindi, l'effettiva capacità di invasione degli sporozoitii è stata visualizzata mediante colorazione di Giemsa (Fig. 1). Dalle conte degli sporozoitii rimasti nel surnatante del primo test di infestazione è stata evidenziata una riduzione significativa delle efficienze di infestazione tra tutti i trattamenti a base di timolo e carvacrolo ( $p \leq 0,0002$ ) rispetto al C +, in particolare THY: CAR e MIX2, mentre con le saponine l'effetto non è stato significativo ( $p = 0,409$ ) (Fig. 2). I risultati di qPCR hanno confermato le conte, poiché era visibile lo stesso trend di inibizione THY: CAR e MIX2 hanno ridotto significativamente la quantità di DNA di *Eimeria tenella* all'interno delle cellule rispetto a C + (i valori p sono rispettivamente 0,022 e  $<0,0001$ ), mentre SAP e MIX1 non differivano da esso. Il DNA di altre specie di *Eimeria* non è stato rilevato all'interno delle cellule (Fig. 3). Nel secondo saggio di invasione, i conteggi del surnatante sono stati effettuati a timepoints. La tendenza all'inibizione era visibile a 2 hpi: SAP e MIX1 non differivano da C +, mentre THY: CAR e MIX2 erano significativamente ridotti rispetto a C + ( $p = 0,003$  e  $0,001$ , rispettivamente). A 24 hpi, l'efficienza di invasione di THY: CAR e MIX2 era significativamente inferiore a C + ( $p < 0,0001$ ); a 48 hpi, tutti i trattamenti hanno ridotto l'efficienza di invasione rispetto a C + ( $p < 0,05$ ). Inoltre, mentre tutti i trattamenti mostravano un aumento dell'infestazione fino a raggiungere un plateau entro le prime 24 hpi, il trattamento MIX2 inibiva definitivamente l'infestazione già nelle prime due ore (Fig. 4). Dalle conte del terzo saggio di infestazione è emersa una diminuzione significativa dell'efficienza di infestazione per il gruppo GO10 ( $p < 0,0001$ ) mentre la dose maggiore (GO100) era citotossica per il monostrato cellulare, perciò è stata esclusa dall'analisi (Fig. 5). L'analisi qPCR ha confermato la diminuzione dell'infestazione con il trattamento GO10 rispetto al C+ ( $p = 0,002$ ) (Fig. 6).

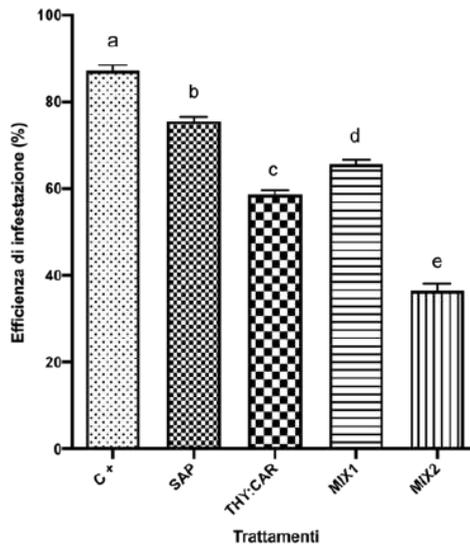
**Fig. 1:** Sporozoitii internalizzati in cellule MDBK colorate con tecnica Giemsa. Le frecce indicano gli sporozoitii intracellulari dopo 24 ore di infestazione.



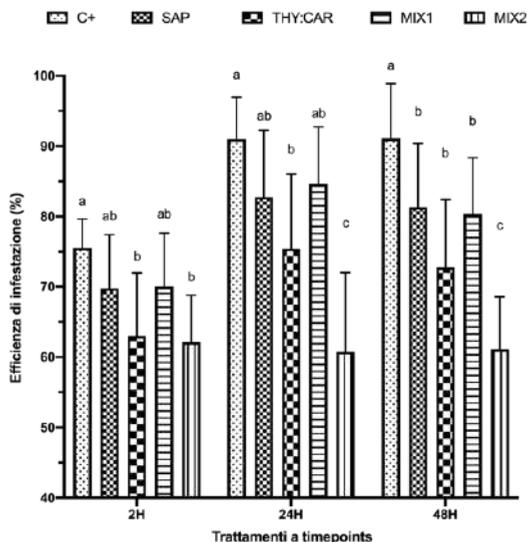
**Fig. 2:** Efficienza di infestazione determinata con conte dei surnatanti nel saggio di infestazione 1. I valori percentuali sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=18). L'analisi statistica è stata effettuata con one-way ANOVA, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).



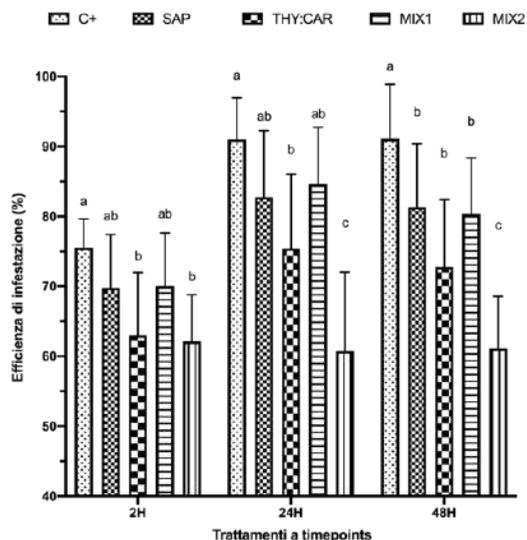
**Fig. 3:** Quantità relativa di DNA intracellulare di *E. tenella* del saggio di infestazione 1. I valori  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=6). L'analisi statistica è stata effettuata con one-way ANOVA, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).



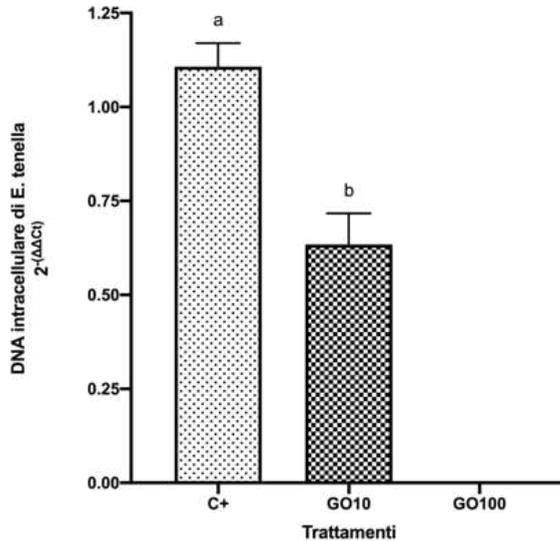
**Fig. 4:** Efficienza di infestazione determinata con conte dei surnatanti del saggio di infestazione 2. I valori percentuali sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=12). L'analisi statistica è stata effettuata con two-way ANOVA, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti all'interno dello stesso timepoint (P £ 0,05).



**Fig. 5:** Efficienza di infestazione determinata con conte dei surnatanti del saggio di infestazione 3. I valori percentuali sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=6). L'analisi statistica è stata effettuata con test T di Student, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).



**Fig. 6:** Quantità relativa di DNA intracellulare di *E. tenella* del saggio di infestazione 3. I valori  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=6). L'analisi statistica è stata effettuata con test T di Student, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).



## DISCUSSIONE

I recenti casi di resistenza ai classici trattamenti anticoccidici e le restrizioni all'uso di antibiotici negli allevamenti hanno aumentato la necessità di effettuare screening su nuovi composti per controllare la diffusione delle specie di *Eimeria* (Giannenas et al., 2003). Gli studi *in vivo* rappresentano uno strumento di routine, ma costi elevati e questioni etiche stanno spingendo verso la valutazione di nuovi metodi per lo screening di sostanze *in vitro* (Thabet, Zhang, Alnassan, Dausgchies, & Bangoura, 2017). Lo scopo di questo studio era replicare un modello di infestazione *in vitro* per *Eimeria* con un metodo adatto per stimare l'efficienza di infestazione su cellule MDBK e utilizzarlo per testare molecole botaniche.

Per prima cosa, gli sporozoi sono stati estratti da campioni fecali di campo multi-specie, i quali sono una valida fonte per esperimenti *in vitro* perché sono più rappresentativi della malattia; infatti, sul campo, i casi di coccidiosi sono solitamente caratterizzati da più specie di *Eimeria*. Nonostante ciò, solo il DNA di *E. tenella* è stato rilevato all'interno delle cellule, suggerendo che potrebbe esserci uno specifico meccanismo di internalizzazione; infatti, ci sono poche prove gli sporozoi di altre specie possano essere internalizzati da MDBK e questo aspetto dovrebbe essere ulteriormente studiato (Alnassan, Thabet, Dausgchies, & Bangoura, 2015; Burt, Tersteeg-Zijderveld, Jongerius-Gortemaker, Vervelde, & Vernooij, 2013; Jitviriyanon et al., 2016). Nel pollo, il bersaglio naturale delle *Eimerie* è l'epitelio intestinale, ma non è ancora disponibile un modello di cellule epiteliali intestinali specifico dell'o-

spite. Altre linee cellulari sono state usate per studiare *Eimeria*, ma alcune sono più permissive di altre (Augustine, 2001a). Tierney e Mulcahy (2003) hanno dimostrato che gli sporozoi di *E. tenella* possono essere internalizzati da diversi modelli cellulari, in particolare cellule renali di criceto, MDBK e cellule renali di coniglio, con differenti efficienze (Tierney & Mulcahy, 2003). In un altro studio, Augustine (2001) ha dimostrato che diverse specie di *Eimeria* differivano nella loro capacità di invadere le cellule, a causa di fattori dipendenti sia dagli sporozoi che dal monostato cellulare (Augustine, 2001b). In realtà, sembra che l'invasione avvenga mediante il riconoscimento di molecole ricettive; nel nostro studio è possibile che le condizioni abbiano consentito solo a *E. tenella* di invadere con successo le cellule.

Per stimare l'efficienza dell'invasione, sono stati conteggiati gli sporozoi nei surnatanti ed è stata effettuata l'analisi qPCR. Entrambi questi metodi sono economici, veloci e affidabili. Studi precedenti applicavano diversi metodi di quantificazione, ma la maggior parte di questi si basa sull'uso di reagenti costosi e pericolosi come anticorpi o composti radioattivi. La qPCR è stata anche utilizzata da Alnassan et al. (2015) e Thabet et al. (2017) per quantificare *E. tenella* in MDBK, ma essi hanno invece applicato un metodo di quantificazione assoluta, utilizzando il gene ITS-1 di *E. tenella* inserito in un plasmide pSCA-amp / kan (Alnassan et al., 2015; Thabet et al., 2017).

Nel presente studio, il citocromo B bovino è stato utilizzato come gene housekeeping per rilevare e normalizzare la quantità di DNA di *Eimeria* nelle cellule invase, applicando così un metodo di quantificazione relativo. Il conteggio degli sporozoi nel surnatante rappresenta un nuovo metodo di quantificazione e non siamo a conoscenza di altri studi in cui è stato utilizzato. Questo si è rivelato uno strumento robusto e preciso e in grado di fornire una rapida stima dell'efficienza di infestazione. Tuttavia, confrontando i risultati ottenuti con qPCR e conteggio degli sporozoi, sono emerse alcune divergenze; anche se la tendenza all'inibizione è mantenuta per tutti i trattamenti, i valori erano abbastanza diversi tra i due metodi. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che per i conteggi, la percentuale di inibizione è calcolata in relazione a tutti gli sporozoi liberi, che sono di varie specie, mentre nel caso di qPCR, è calcolata sul DNA di una sola specie di *Eimeria* (in questo caso era solo *E. tenella*). Questo è probabilmente il motivo per cui i due metodi non potevano essere completamente confrontabili, quindi i conteggi degli sporozoi sono stati scelti come miglior marcatore per questo studio.

Tra i trattamenti testati, le miscele a base di timolo e carvacolo si sono rivelate le più efficaci. Anche altri studi hanno dimostrato che timolo e carvacolo esercitano un'attività antiparassitaria su *Eimeria* e il loro meccanismo d'azione è legato alla distruzione della membrana degli sporozoi e alla conseguente perdita di ioni calcio dal parassita, essenziale per il processo di invasione cellulare (Bozkurt, Giannenas, Küçükyilmaz, Paneri, & P-Florou, 2013; Sárközi et al., 2007) ortho-vanillin, meta-anisaldehyde. Studi sulle saponine rivelano che questi composti possono interagire con il colesterolo sulla membrana degli sporozoi, ostacolando così il ciclo di vita di *Eimeria* (Bozkurt et al., 2013). Nel presente studio, i risultati suggeriscono che timolo e carvacolo esercitano il principale effetto inibitore sugli sporozoi e le saponine agiscono come adiuvanti, ma non hanno di per sé una forte azione inibitrice. Le saponine potrebbero invece facilitare l'attività del timolo e del carvacolo sugli sporozoi. In effetti, i dati del secondo saggio di invasione evidenziano che gli

sporozoiti impiegano 24 ore per completare il processo di invasione. L'azione di timolo, carvacrolo e saponine era invece già visibile a 2 hpi nei gruppi THY: CAR e MIX2. Tuttavia, solo MIX2 è riuscita a fermare l'infestazione a 2 hpi, mentre in tutti gli altri trattamenti il processo è durato più a lungo. Ciò suggerisce che le saponine potrebbero aumentare il potere anticoccidico del timolo e del carvacrolo consentendo un'azione molto rapida di questi composti.

L'attività del timolo e del carvacrolo contro *Eimeria* è stata precedentemente discussa da Giannenas et al. (2003) e Küçükyılmaz et al. (2012) in prove *in vivo*. Entrambi hanno scoperto che gli oli essenziali di origano, ricchi di timolo e carvacrolo, contribuiscono a migliorare la salute degli animali durante un challenge con coccidi e a ridurre il numero di oocisti escrete nelle feci. Nello studio di Giannenas et al. è stato rilevato un aumento del peso corporeo simile al gruppo non infetto nei polli trattati con oli essenziali, nello studio di Küçükyılmaz et al. è stato anche riscontrato un miglioramento della risposta immunitaria. Burt et al. ha analizzato l'effetto di miscele contenenti carvacrolo su MDBK *in vitro* e ha riscontrato che il carvacrolo inibiva in modo significativo l'invasione di MDBK da parte di *E. tenella*. In questi studi, la composizione delle miscele era variabile e sono stati utilizzati metodi di rilevamento differenti; è quindi difficile confrontare i risultati (Burt et al., 2013; Giannenas et al., 2003; Küçükyılmaz et al., 2012). Ad ogni modo, l'efficacia anticoccidica di queste molecole è stata ulteriormente confermata dai risultati di questo studio.

In questo studio è stata valutata anche l'efficacia anticoccidica dell'olio di aglio. Dai risultati si evince che anche questo composto ha un effetto importante sugli sporozoiti, ma ad alte concentrazioni è citotossico per il monostrato cellulare. Altri studi sono stati condotti su composti dell'olio d'aglio, come l'allicina, ed è stato confermato il forte effetto antiparassitario (Alnassan et al., 2015). Il meccanismo d'azione dell'allicina deve essere ancora compreso in dettaglio, ma sembra essere collegato all'inibizione di enzimi contenenti cisteina, grazie alla presenza di un gruppo solfossido nella struttura dell'allicina (Borlinghaus, Albrecht, Gruhlke, Nwachukwu, & Slusarenko, 2014). Ciò spiega come l'attività di allicina e olio d'aglio non sia specifica per i parassiti e che la dose più alta del composto possa comportare un effetto indesiderato sulle cellule. Ulteriori studi con più concentrazioni saranno effettuati per determinare la tossicità su questa linea cellulare e sugli sporozoiti.

## CONCLUSIONI

La letteratura scientifica presenta uno scarso numero di studi su *Eimeria* e quelli disponibili sono molto diversi e difficili da confrontare tra loro. Il protocollo applicato in questo studio può essere utilizzato per vagliare velocemente e con successo altri composti a varie dosi al fine di sostituire e ridurre il sacrificio degli animali impiegati in test *in vivo*. Per migliorare la ricerca in questo settore, potrebbe essere utile studiare un metodo valido e universale per gli studi *in vitro* su *Eimeria* che rispetti le linee guida "3R" e questo studio è uno dei primi a utilizzare campioni di campo in modo efficace per lo screening di sostanze *in vitro*. È stato inoltre dimostrato che le miscele di timolo e carvacrolo e olio di aglio sono interessanti per il trattamento della coccidiosi; le modalità d'azione effettive devono essere chiarite in futuro, studiando il pathway metabolico e il ciclo di vita degli sporozoiti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, R. Z., Colwell, D. D., & Gilleard, J. (2012). Botanicals: An alternative approach for the control of avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*, 68(2), 203–215. <https://doi.org/10.1017/S0043933912000268>
2. Ali, M., Chand, N., Ullah Khan, R., Naz, S., & Gul, S. (2019). Anticoccidial effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) against experimentally induced coccidiosis in broiler chickens. *JOURNAL OF APPLIED ANIMAL RESEARCH*, 47, 79–84.
3. Alnassan, A. A., Thabet, A., Dauschies, A., & Bangoura, B. (2015). In vitro efficacy of allicin on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology Research*, 114(10), 3913–3915. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4637-2>
4. Augustine, P. C. (2001a). Cell: Sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *International Journal for Parasitology*, 31(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00150-8)
5. Augustine, P. C. (2001b). Invasion of Different Cell Types by Sporozoites of *Eimeria* Species and Effects of Monoclonal Antibody 1209-C2 on Invasion of Cells by Sporozoites of Several Apicomplexan Parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(2), 177–181.
6. Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C. H., Nwachukwu, I. D., & Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: Chemistry and biological properties. *Molecules*, 19(8), 12591–12618. <https://doi.org/10.3390/molecules190812591>
7. Bozkurt, M., Giannenas, I., Küçükyılmaz, K., Paneri, E., & P-Florou, C. (2013). An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *British Poultry Science*.
8. Burt, S. A., Tersteeg-Zijderveld, M. H. G., Jongerius-Gortemaker, B. G. M., Vervelde, L., & Vernooij, J. C. M. (2013). In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Veterinary Parasitology*, 191(3–4), 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.001>
9. Cobaxin-Cardenas, M. E. (2018). Natural Compounds as an Alternative to Control Farm Diseases: Avian Coccidiosis. In R. E. Quiroz-Castañeda (Ed.), *Farm animal diseases, recent omic trends and new strategies of treatment* (pp. 135–149). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
10. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587–605. <https://doi.org/10.1079/bjn2002725>
11. Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N. A., & Spais, A. B. (2003). Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition*, 57(2), 99–106. <https://doi.org/10.1080/0003942031000107299>
12. Jitviriyanon, S., Phanthong, P., Lomarat, P., Bunyapraphatsara, N., Porntrakulpipat, S., & Paraksa, N. (2016). In vitro study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 228, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.020>
13. Küçükyılmaz, K., Bozkurt, M., Selek, N., Güven, E., Eren, H., Atasever, A., ... Çinar, M. (2012). Effects of vaccination against coccidiosis, with and without a specific herbal essential oil blend, on performance, oocyst excretion and serum

- IBD titers of broilers reared on litter. *Italian Journal of Animal Science*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e1>
14. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
  15. Moore, R. J. (2016). Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathology*, 45(3), 275–281. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1150587>
  16. Nazzaro, F., Fratianni, F., de Martino, L., & Coppola, R. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451–1474.
  17. Peek H.W., L. W. J. . (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccine and other prevention strategies. *Veterinary Quarterly*, 31(3), 143–161.
  18. Quiroz-Castañeda, R. E., & Dantán-González, E. (2015). Control of avian coccidiosis: Future and present natural alternatives. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/430610>
  19. Russel, W.M.S and Burch, R. . (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. In *London: Methuen*. <https://doi.org/10.1177/0162243917726579>
  20. Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 429–438. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
  21. Sárközi, S., Almássy, J., Lukács, B., Dobrosi, N., Nagy, G., & Jóna, I. (2007). Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and ryanodine receptor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 28(2–3), 167–174. <https://doi.org/10.1007/s10974-007-9113-x>
  22. Shirley, M. W. (1995). Eimeria species and strains of chickens. In *Guidelines on techniques in coccidiosis research* (pp. 1–25).
  23. Singh, V. P., Pratap, K., Sinha, J., Desiraju, K., Bahal, D., & Kukreti, R. (2016). Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4), 551–561. <https://doi.org/10.1177/0394632016671728>
  24. Thabet, A., Zhang, R., Alnassan, A. A., Dauschies, A., & Bangoura, B. (2017). Anticoccidial efficacy testing: In vitro Eimeria tenella assays as replacement for animal experiments. *Veterinary Parasitology*, 233, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.005>
  25. Tierney, J., & Mulcahy, G. (2003). Comparative development of Eimeria tenella (Apicomplexa) in host cells in vitro. *Parasitology Research*, 90(4), 301–304. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0846-1>

## **RICOSTRUZIONE TRAMITE UN APPROCCIO FILODINAMICO DELLA CIRCOLAZIONE DI AVIAN METAPNEUMOVIRUS SOTTOTIPO B IN EUROPA**

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

<sup>1</sup>*Università degli studi di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e salute (MAPS), Viale dell'Università 16. 35020, Legnaro (PD)*

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

### **Summary**

Avian Metapneumovirus (aMPV) has been recognized as a respiratory pathogen of turkey and chickens for a long time. In recent years, a crescent awareness of the clinical and economic burden of aMPV, especially subtype B, has been rising among European researchers and field veterinarians. Nevertheless, the knowledge of its epidemiology and evolution is still scattered and limited, whereas a cohesive depiction would be of great relevance for the planning of effective control measures. In the present study, the broadest available collection of partial G gene sequences obtained from European aMPV-B strains was analysed using different phylodynamic and biostatistical approaches to reconstruct the viral spreading over time, as well as the role of different hosts in affecting its evolution. The obtained results demonstrate that after its introduction, approximatively in 1985 in France, the infection spread relatively quickly, involving Western and Mediterranean Europe until the end of the 1990s, and then Eastern Europe from the beginning of the new millennium, in parallel with an increase of viral population size. In the following period, a wider mixing among aMPV-B strains could be observed. Interestingly, most of the within-country genetic heterogeneity was ascribable to single or few introduction events, followed by local circulation. This, combined with the high evolutionary rate herein proven, led to the establishment of genetically and phenotypically different clusters among countries. Such variability could have a significant impact on vaccine-induced cross-protection, which should, therefore, be carefully evaluated. On the contrary, while a significant strain exchange was proven among turkeys, guinea fowls and chickens, no evidence of differential selective pressures or specific amino-acid mutations was observed, suggesting that no host adaptation is occurring. Overall, the present study highlights a sporadic but effective aMPV-B migration among countries, followed by local expansion and genetic diversification driven by the intrinsically high viral evolutionary rate. The presence of different amino acid patterns among strains circulating in particular countries could affect the efficacy of natural or vaccine-induced immunity and should be accounted for when planning control measures implementation.

### **INTRODUZIONE**

Il Metapneumovirus aviario (aMPV) è un patogeno che colpisce in particolare il pollo e il tacchino, sebbene altre specie possano essere infettate. È associato a

infezioni del tratto respiratorio superiore che possono portare a rilevanti manifestazioni cliniche e conseguenti perdite economiche, in particolar modo in presenza di infezioni secondarie. aMPV è classificato nella famiglia *Pneumoviridae*, genere *Metapneumovirus*, ed è caratterizzato da un genoma a singolo filamento di RNA con polarità positiva della lunghezza di circa 15 Kb, contenente 8 geni: Nucleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrix (M), Fusion (F), Matrix2 (M2), Small hydrophobic (SH), Attachment (G) e Large polymerase (L). I geni L e P codificano per proteine non strutturali, implicate nella replicazione del genoma virale, mentre le restanti codificano per i componenti del capsido, della matrice e dell'*envelope* virale (Cecchinato et al., 2017). Fra queste, la maggior parte degli studi si sono focalizzati sulla proteina G, una proteina dell'*envelope* necessaria per l'adesione virale alla cellula. Sfortunatamente, non sono ad oggi disponibili studi fini inerenti l'interazione di questa proteina con i recettori dell'ospite e con la sua risposta immunitaria. Cionondimeno, essa è considerata il principale target della risposta immunitaria, in funzione del suo ruolo biologico e della localizzazione sulla superficie virale. Studi preliminari hanno suggerito la presenza di epitopi della risposta cellulare e l'evoluzione direzionale di questa proteina dopo l'introduzione della vaccinazione ne lascia presupporre una significativa rilevanza immunologica. La variabilità genetica del gene G ne ha inoltre determinato l'uso per studi epidemiologici e filogenetici, favorendo una certa attività di sequenziamento. Dopo la sua prima identificazione in Sud Africa sul finire degli anni '70, aMPV e le sindromi da esso causate sono state descritte in diversi stati Europei: Regno Unito, Francia, Spagna, Germania, Ungheria e Italia (Cecchinato et al., 2017). Successivamente la sua presenza è stata riportata a livello mondiale. Sulla base della variabilità genetica sono stati identificate 4 sottotipi (A-D) (Juhász and Easton, 1994). Tradizionalmente i sottotipi A e B sono stati considerati la principale minaccia per l'allevamento europeo, tuttavia studi recenti stanno progressivamente evidenziando una sostanziale assenza del sottotipo A, a favore di aMPV-B (Franzo et al., 2017b; Tucciarone et al., 2018; Andreopoulou et al., 2019). Paradossalmente, nonostante la rilevanza di questo sottotipo e la crescente preoccupazione sia nel mondo scientifico che fra i veterinari di campo, le nostre conoscenze sulla reale epidemiologia, pattern di diffusione, dinamiche di popolazione ed evoluzione di aMPV-B sono, ad oggi, scarse. Per cercare di colmare questa lacuna, nel presente studio è stata eseguita una analisi filodinamica su un ampio database di sequenze parziali del gene G ottenute da ceppi europei di aMPV-B.

## **MATERIALI E METODI**

### *Preparazione del dataset*

Tutte le sequenze disponibili del gene G di ceppi Europei di aMPV-B sono state scaricate da Genbank. Le sequenze sono state incluse solo qualora le informazioni riguardanti l'anno e il paese di campionamento fossero disponibili; quando possibile anche la specie ospite è stata annotata. Inoltre, le sequenze dei principali vaccini utilizzati sono state considerate e allineate con le altre utilizzando MAFFT (Standley, 2013). Poiché la presenza di ceppi ricombinanti o di origine vaccinale può alterare la ricostruzione degli alberi filogenetici, la stima dei parametri di popolazione e oscurare il segnale temporale, queste sequenze sono state rimosse dal dataset. In particolare la presenza di fenomeni di ricombinazione è stata indagata

tramite GARD (Pond et al., 2006) mentre potenziali ceppi di origine vaccinale sono stati rimossi sulla base dei seguenti criteri di esclusione:

1. Robusto clustering (bootstrap > 70) con i ceppi vaccinali;
2. Percentuale di identità nucleotidica più alta del 99% rispetto ai vaccini;
3. Studio di posizioni marker precedentemente identificate;
4. “*Expert opinion*”, basata sulla valutazione della congruenza temporale tra la commercializzazione del vaccino e l’anno di campionamento del potenziale ceppo *vaccine-like* ad esso correlato.

La presenza di un adeguato segnale filogenetico e temporale è stata valutata sul database epurato delle succitate sequenze utilizzando rispettivamente il metodo di *likelihood mapping*, implementato in Iq-Tree (Trifinopoulos et al., 2016) e TempEst (Rambaut et al., 2016).

#### *Analisi filodinamica*

Le stime degli antenati comuni (*time to Most Recent Common Ancestor*; tMRCA), il tasso di sostituzione nucleotidica e le dinamiche di popolazione sono state ottenute utilizzando il metodo della coalescente seriale tramite l’approccio Bayesiano implementato in BEAST 1.8.4. (Drummond and Rambaut, 2007). La ricostruzione delle dinamiche di popolazione è stata effettuata utilizzando il metodo non parametrico *SkyGrid* (Gill et al., 2013), mentre i pattern di migrazione geografica sono stati stimati utilizzando un modello a tratti discreti (i.e. codificante lo Stato dove il ceppo è stato campionato come una caratteristica categorica del ceppo stesso) come descritto da Lemey et al. (2009) (Lemey et al., 2009). Un approccio del tutto comparabile è stato utilizzato per ricostruire i salti di specie fra i diversi ospiti nel corso del tempo. In entrambi i casi, la significatività statistica delle migrazioni fra Stati o ospiti è stata valutata tramite Bayesian Stochastic Search Variable Selection. Tutti i parametri sono stati stimati congiuntamente tramite una Markov Chain Monte Carlo di 1 miliardo di generazioni. I risultati sono stati accettati valutando l’adeguatezza della convergenza della simulazione e la presenza di un Estimate Sample Size maggiore di 200. Dopo esclusione come *burn-in* del 20% degli alberi e dei valori campionati, è stato ricostruito il Maximum Clade Credibility Tree e i vari parametri della popolazione virale sono stati riassunti in termini di media, mediana e 95% High Posterior Probability (95HPD).

#### *Analisi delle pressioni selettive*

L’azione delle pressioni selettive è stata valutata per evidenziare eventuali differenze nella loro intensità fra i ceppi campionati in polli e tacchini, sia a livello globale che indipendentemente per ciascun codone della proteina. La presenza di pressioni episodiche direzionali è stata testata ponendo i ceppi campionati da pollo come punto di arrivo della spinta evolutiva.

## **RISULTATI**

### *Dataset*

Settantuno sequenze delle 202 inizialmente incluse sono state escluse dallo studio in quanto classificate come di origine vaccinale. Conseguentemente, il dataset fi-

nale includeva 131 sequenze della lunghezza di 330 paia di basi, campionate da 9 Stati europei (Francia, Grecia, Italia, Romania, Russia, Spagna, Olanda, Ucraina e Regno Unito) nel periodo 1985-2019. Nonostante la regione genomica considerata fosse relativamente piccola, sia l'intensità del segnale filogenetico che temporale sono risultate adeguate, rendendo possibili le successive analisi.

#### *Analisi filodinamica*

Il tMRCA dei ceppi europei di aMPV-B è stato stimato nel 1981.17 (95HPD 1971.93-1985.28) e il tasso evolutivo era  $1.21 \cdot 10^{-3}$  (95HPD  $7.11 \cdot 10^{-4}$ - $7.11 \cdot 10^{-3}$  sostituzioni per sito per anno). La ricostruzione delle dinamiche di popolazione ha evidenziato, dopo un marcato incremento a seguito dell'introduzione di aMPV in Europa, una sostanziale stabilità fino indicativamente al 2015, quando si è potuto constatare l'inizio di un lento declino (Figura 1). L'analisi filogeografica ha dimostrato la tendenza a formare dei cluster specifici per ogni paese, in cui singoli eventi introduttivi sembrano in grado di spiegare in massima parte la variabilità genetica entro-stato. In particolare, la prima introduzione di aMPV sembra essere avvenuta in Francia nel 1981 (95HPD 1971.93-1985.28), cui è seguita la migrazione in Italia pochi anni dopo, nel 1984 (95HPD 1980.38-1986.98). Questi 2 paesi si sono rivelati la principale fonte di diffusione di aMPV in altri stati Europei, inclusa l'Olanda nel 1987 (95HPD 1984.07-1989.73), il Regno Unito nel 1989 (95HPD 1987.33-1992.25) e la Russia nel 1996 (95HPD 1989.71-2000.9). La Russia è stata successivamente coinvolta nella diffusione virale in Ucraina nel 2007 (95HPD 2003.62-2008.61), in Spagna nel 2005 (95HPD 200.97-2007.51) e nuovamente in Italia nel 2012 (95HPD 2008.97-2014.96). Nei successivi anni l'Italia è stata poi implicata nell'introduzione di stipiti in Spagna nel 2011 (95HPD 2008.38-2011.18), in Grecia nel 2012 (95HPD 2013.23-2012.99) e in Francia nel 2012 (95HPD 2008.97-2014.95). Una potenziale connessione è stata stimata fra Spagna e Romania nel 2015 (95HPD 2012.38-2016.95). Tuttavia, solamente i link epidemiologici da Francia a Italia e Olanda, dall'Italia alla Grecia e Spagna, dalla Spagna alla Romania e dalla Russia all'Ucraina hanno dimostrato un robusto supporto statistico. (Figura 2a). L'analisi della relazione fra ceppi virali e specie ospite ha mostrato una certa associazione, sebbene diverse eccezioni siano state dimostrate, in special modo in paesi come l'Italia dove pollo e tacchino sono allevati in stretta vicinanza. I ceppi campionati da faraona erano parte di tre differenti cluster, e i rispettivi antenati sono sempre stati predetti essere dei ceppi campionati da tacchino. Conseguentemente, i salti di specie con adeguato supporto statistico sono risultati essere fra pollo e tacchino e fra tacchino e faraona (Figura 2b).

#### *Pressioni selettive*

L'analisi delle pressioni selettive differenziali che agiscono su ceppi campionati da pollo e da tacchino ha evidenziato solo una posizione (i.e. aa 83) dove i ceppi campionati da pollo erano soggetti a pressioni selettive più intense. Parallelamente, l'analisi di pressioni selettive direzionali agenti su ceppi introdotti nel pollo ha evidenziato una tendenza a mutare verso l'aminoacido alanina in posizione 102. Ad ogni modo, quando l'azione delle forze selettive, la proporzione dei siti coinvolti e il regime selettivo (ossia la combinazione del numero di siti coinvolti e l'intensità delle pressioni) sono state comparate fra l'allineamento dei ceppi di pollo e quelli di tacchino, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative.

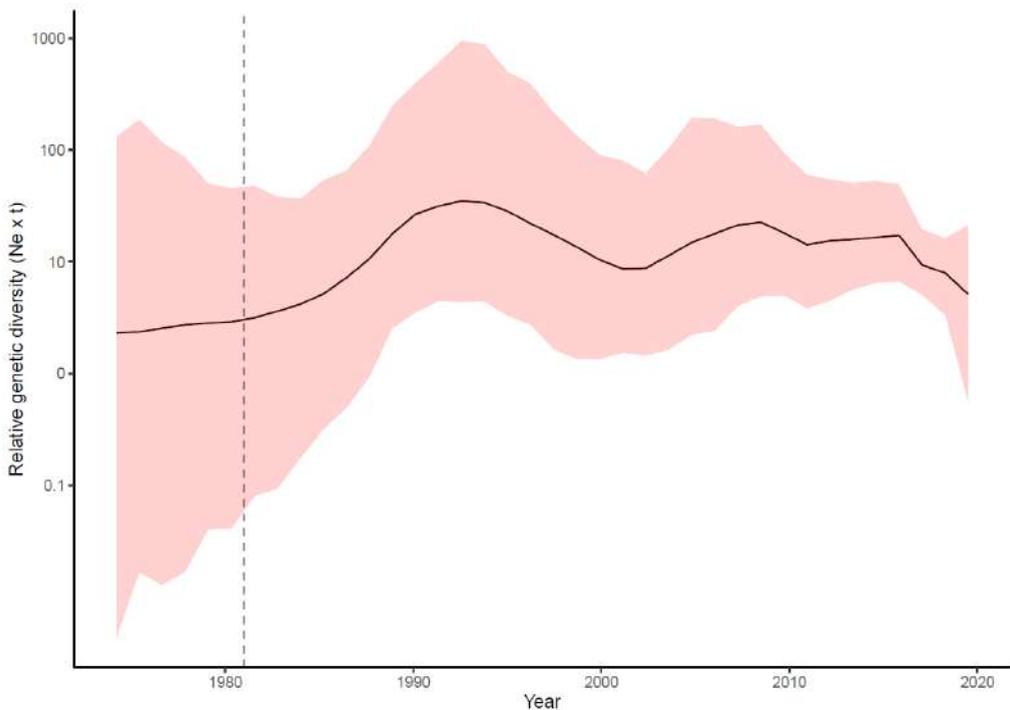
## DISCUSSIONE

Nonostante aMPV sia un patogeno rilevante per l'allevamento avicolo in Europa, la nostra conoscenza sulla sua epidemiologia molecolare è tuttora scarsa e basata su un numero limitato di studi svolti da alcuni gruppi di ricerca. Il presente studio si propone di fornire una visione di insieme sull'epidemiologia ed evoluzione di questo virus sulla base di più robusti modelli statistici. Per fare ciò si sono dovuti superare due principali ostacoli. In primo luogo, la scarsa disponibilità di sequenze liberamente accessibili e adeguatamente annotate, che conferma la scarsa attività di sequenziamento di molti gruppi di ricerca europei. Fortunatamente, il recente rilascio di un buon numero di sequenze (Mescolini et al., 2020) raccolte da diversi paesi nel corso del tempo ha permesso di aumentare la rappresentatività del database a nostra disposizione. In secondo luogo, l'ampio uso di vaccini vivi attenuati, in grado di circolare per lunghi periodi in condizioni di campo, potenzialmente anche come ceppi revertanti (Cecchinato et al., 2014), ha complicato la differenziazione fra ceppi di campo e ceppi vaccinali o di origine vaccinale. Poiché i ceppi vaccinali sono continuamente introdotti, ma non evolvono (almeno non fino a quando non iniziano a replicare negli animali), il sequenziamento del medesimo stivite vaccinale in anni diversi può oscurare il segnale temporale e portare a dei *bias*. L'approccio utilizzato per rimuovere le sequenze di probabile origine vaccinale è parso tuttavia efficace, come dimostrato da un netto miglioramento nel segnale temporale stesso dopo la rimozione di queste sequenze. Sulla base di tali evidenze, le stime sull'origine e la storia di aMPV-B possono essere considerate affidabili. È importante notare come tale introduzione in Europa sia stata stimata in Francia nel 1981, e corrisponde in modo molto preciso ai risultati dei primi report basati su evidenze di tipo epidemiologico (Giraud et al., 1986). Successivamente, la diffusione è stata rapida, coinvolgendo inizialmente i paesi dell'Europa occidentale e mediterranea fino a circa la fine degli anni '90, quando una diffusione verso est è stata osservata indicativamente all'inizio del nuovo millennio. Nel successivo periodo è stato osservato un ampio rimescolamento fra i ceppi di aMPV campionati nell'Europa orientale e occidentale, con Francia, Italia e Spagna principalmente coinvolte nella diffusione virale in questa fase. A causa della limitata disponibilità di informazione non è semplice spiegare con precisione le cause dietro lo scenario osservato. Una simile, rapida diffusione è stata dimostrata anche per diversi genotipi della bronchite infettiva (Franzo et al., 2017a; Franco Giovanni et al., 2018). La presenza di un mercato unico europeo, il commercio di animali vivi su lunghe distanze e l'intensificarsi delle produzioni animali possono sicuramente aver favorito questo processo. Non può non essere menzionato però, che la crescente disponibilità di sequenze nel tempo aver possa aver condizionato i risultati ottenuti, permettendo di identificare una più fitta rete di contatti solo negli ultimi anni. Il ruolo di Francia e Italia nella diffusione del virus è stato a lungo attribuito alle dimensioni della popolazione di tacchini in questi stati, specie tradizionalmente considerata l'ospite principale di aMPV. Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato un'elevata presenza dell'infezione anche nei polli (Tucciarone et al., 2018; Andreopoulou et al., 2019) e la presente analisi ha dimostrato un frequente scambio di ceppi fra le 2 popolazioni, sminuendo questa ipotesi. Con buona probabilità, anche in questo caso, il maggior numero di sequenze ottenute da alcuni stati potrebbe aver portato ad una sovrastima del loro ruolo epidemiologico. Un'altra ipo-

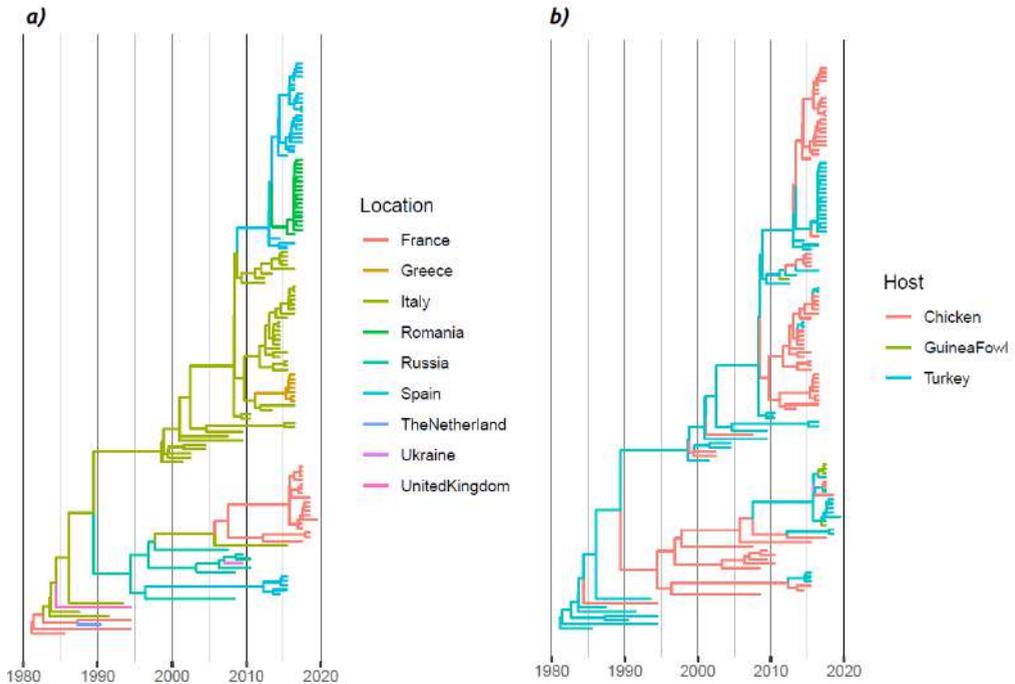
tesi affascinante chiama in causa gli uccelli selvatici migratori (Jones, 1996). La presenza di rotte migratorie fra stati mediterranei e la Russia potrebbe giustificare il flusso virale bidirezionale fra queste regioni. Tuttavia, le limitatissime informazioni inerenti la suscettibilità dei volatili selvatici all'infezione e il loro ruolo epidemiologico impongono grande cautela (Heffels-Redmann et al., 1998). Un'ipotesi alternativa è che l'assenza di sequenze, rispondenti ai nostri criteri di inclusione, in molti Stati dell'Europa orientale possa celare un più lento processo di diffusione, come sembrano suggerire alcuni report di epidemiologia classica (Cecchinato et al., 2017). A prescindere da queste incertezze, è stato possibile evidenziare una chiara tendenza dei ceppi di aMPV-B a clusterizzare in base allo Stato di campionamento. È stato inoltre identificato un numero molto limitato di eventi introduttivi multipli. Ne consegue che, similmente a quanto dimostrato per IBV, l'introduzione di nuovi stiptipi è un evento sostanzialmente raro. Tuttavia, la capacità di contenerne la successiva diffusione all'interno di uno Stato attraverso adeguate misure di biosicurezza e controllo appare limitata. In tal senso è interessante notare come negli ultimi anni si sia osservato un trend decrescente nelle dimensioni della popolazione virale, che potrebbe essere almeno in parte ascrivibile a una maggiore applicazione in alcuni stati di protocolli vaccinali anche nei broiler. Questa evidenza è in apparente contrasto con l'attuale percezione dei veterinari di campo, che sovente riportano aMPV come una crescente problematica. Tuttavia, l'apparente aumento della prevalenza percepita potrebbe riflettere una più intesa attività diagnostica, piuttosto che un reale mutamento dello scenario epidemiologico. Sebbene non fossero stati condotti studi rigorosi, aMPV era considerato un patogeno a lenta evoluzione. Le stime ottenute dimostrano uno scenario radicalmente diverso, caratterizzato da un tasso evolutivo pienamente comparabile a quello di altri virus a RNA. Questa variabilità genotipica ha evidenti ripercussioni a livello aminoacidico. Come facilmente prevedibile, membri della stessa *clade* tendono a manifestare analoghe mutazioni aminoacidiche, pur in presenza di rilevanti eccezioni, potenzialmente classificabili come fondi-ciechi o varianti a bassa fitness, oppure come varianti emergenti non ancora diffusi. Poiché sussiste anche una chiara associazione fra localizzazione geografica e *clade*, si può concludere che Stati diversi alberghino ceppi con caratteristiche fenotipiche differenti. I vaccini attualmente in uso, sebbene efficaci nel prevenire la sintomatologia, non sono in grado di prevenire l'infezione e l'escrezione virale, contribuendo probabilmente alla persistenza della circolazione di aMPV-B nei diversi stati. Se questa variabilità fenotipica condizioni l'efficacia della vaccinazione dovrebbe essere oggetto di ulteriori studi al fine di permettere la selezione del vaccino più adeguato al peculiare contesto epidemiologico. Al contrario, non si è potuta evidenziare nessuna associazione evidente fra ospite e sequenza aminoacidica, almeno nella regione genomica considerata. Sebbene l'analisi statistica abbia evidenziato alcuni siti sottoposti ad una pressione differenziale fra ceppi campionati in pollo e tacchino, queste mutazioni interessavano un numero molto limitato di ceppi. In aggiunta, un'analisi più complessiva che prendesse in considerazione l'intero allineamento non ha evidenziato differenze significative fra le 2 specie. Nel complesso, i risultati ottenuti non sembrano sostenere la presenza di un adattamento ospite-specifico dei ceppi di aMPV-B. Se altre regioni del genoma virale siano coinvolte dovrà essere oggetto di futuri studi. In conclusione, il presente studio dimostra che dopo

la prima introduzione in Europa, aMPV-B si è rapidamente diffuso dapprima nei paesi occidentali e mediterranei e successivamente in quelli dell'est. Tuttavia, lo scenario epidemiologico è dominato principalmente da singoli eventi introduttivi, cui è seguito il mantenimento e l'evoluzione indipendente in ciascuno stato. Poiché questo ha comportato la circolazione di ceppi con caratteristiche fenotipiche differenti nei diversi paesi, l'efficacia dei singoli vaccini dovrebbe essere presa in considerazione per permetterne una somministrazione più oculata. Sebbene rilevanti, i risultati ottenuti sono senza dubbio limitati dalla numerosità di sequenze attualmente disponibili, dalla mancanza di standardizzazione nel tratto genomico sequenziato e talvolta dalla scarsa attitudine nella condivisione dei dati. Questi fattori dovrebbero essere significativamente migliorati per permettere una adeguata comprensione dell'epidemiologia e del ruolo di aMPV, permettendone un efficace controllo.

**Figura 1.** Ricostruzione delle dinamiche di popolazione nel corso del tempo. Il valore medio è rappresentato da una linea nera mentre il 95HPD è rappresentato dall'area ombreggiata in rosso. La ricostruzione è riportata a partire dall'origine stimata dell'antenato comune (tMRCA), il cui 95HPD superiore è riportato come una linea verticale tratteggiata.



**Figura 2.** Maximum Clade Credibility Tree rappresentante le relazioni fra i ceppi di aMPV-B Europei, scalati nel corso del tempo. Gli Stati (a) e gli ospiti (b) in cui i ceppi sono stati campionati, e la stima della medesima caratteristica negli antenati, sono riportati utilizzando un codice-colore.



## BIBLIOGRAFIA

1. Andreopoulou, M., Franzo, G., Tucciarone, C.M., Prentza, Z., Koutoulis, K.C., Cecchinato, M., Chaligianni, I., 2019. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus in Greece. *Poult. Sci.* 98, 5374–5384. doi:10.3382/ps/pez360
2. Cecchinato, M., Catelli, E., Lupini, C., Ricchizzi, E., Prosperi, S., Naylor, C.J., 2014. Reversion to virulence of a subtype B avian metapneumovirus vaccine: Is it time for regulators to require availability of vaccine progenitors? *Vaccine* 32, 4660–4664. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.030
3. Cecchinato, M., Ferreira, H.L., Munir, M., Catelli, E., 2017. Avian metapneumovirus., in: *Mononegaviruses of Veterinary Importance. Volume 2: Molecular Epidemiology and Control.* CABI, pp. 127–143. doi:10.1079/9781780644172.0127
4. Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214. doi:10.1186/1471-2148-7-214

5. Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C.M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., Ciccozzi, M., Lavazza, A., Cecchinato, M., Moreno, A., 2017a. 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. doi:10.1371/journal.pone.0184401
6. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Enache, M., Bejan, V., Ramon, G., Koutoulis, K.C., Cecchinato, M., 2017b. First Report of Avian Metapneumovirus Subtype B Field Strain in a Romanian Broiler Flock During an Outbreak of Respiratory Disease. *Avian Dis.* 61, 250. doi:10.1637/11557-121216-resnote.1
7. Franzo, G., Cecchinato, M., Tosi, G., Fiorentini, L., Faccin, F., Tucciarone, C.M., Trogu, T., Barbieri, I., Massi, P., 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, e0203513. doi:10.1371/journal.pone.0203513
8. Gill, M.S., Lemey, P., Faria, N.R., Rambaut, A., Shapiro, B., Suchard, M.A., 2013. Improving Bayesian Population Dynamics Inference: A Coalescent-Based Model for Multiple Loci. *Mol. Biol. Evol.* 30, 713–724. doi:10.1093/molbev/mss265
9. Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M., Toquin, D., others, 1986. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet. Rec.* 119, 606–607.
10. Heffels-Redmann, U., Neumann, U., Braune, S., Cook, J.K.A., Prüter, J., 1998. Serological evidence for susceptibility of sea gulls to avian pneumovirus (APV) infection., in: *Proceedings International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry*, Raischholzhausen, Germany, 15-18 June 1998. pp. 23–25.
11. Jones, R.C., 1996. Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. *Avian Pathol.* doi:10.1080/03079459608419171
12. Juhasz, K., Easton, A.J., 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: Evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75, 2873–2880. doi:10.1099/0022-1317-75-11-2873
13. Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A.J., Suchard, M.A., 2009. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000520. doi:10.1371/journal.pcbi.1000520
14. Mescolini, G., Lupini, C., Franzo, G., Quaglia, G., Legnardi, M., Cecchinato, M., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Turblin, V., Biarnés, M., Tatone, F., Falchieri, M., Catelli, E., 2020. What is new on molecular characteristics of Avian metapneumovirus strains circulating in Europe? *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13788. doi:10.1111/tbed.13788
15. Pond, S.L.K., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., Frost, S.D.W., Kosakovsky Pond, S.L., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., Frost, S.D.W., 2006. GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22, 3096–3098. doi:btl474 [pii]
16. Rambaut, A., Lam, T.T., Max Carvalho, L., Pybus, O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2, vew007. doi:10.1093/ve/vew007

17. 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]
18. 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
19. Tucciarone, C.M., Franzo, G., Lupini, C., Alejo, C.T., Listorti, V., Mescolini, G., Brandão, P.E., Martini, M., Catelli, E., Cecchinato, M., 2018. Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97, 503–509. doi:10.3382/ps/pex350

# STUDIO DELLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA NEGLI ALLEVAMENTI DI POLLASTRE DELLA LINEA OVAIOLA DA CONSUMO NEL PERIODO MAGGIO - SETTEMBRE 2019

Gambi L.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Koutoulis K.<sup>3</sup>, Barbieri I.<sup>4</sup>, Massi P.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede Territoriale di Forlì, Via Don Eugenio Servadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC), Italia;

<sup>2</sup> Azienda ULSS 8 Berica - Viale Ridolfi 37 - 36100 Vicenza, Italia;

<sup>3</sup> Ceva Santé Animale, 10 Avenue de la Ballastière, 33500 Libourne– France;

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto Tecnologie Biologiche Applicate, Via A.Bianchi 9, 25124 Brescia (BS), Italia.

## Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is the causative agent of the acute and highly contagious infectious bursal disease (IBD). IBD is one of the economically most important diseases that affects commercially produced chickens worldwide. Vaccination is widely used to control IBD in boiler chickens and in rearing pullets. Different IBDV vaccines are available in Italy including: conventional live and inactivated vaccines, IBDV immune complex vaccines and live viral vector vaccines. In Italy the occurrence and the circulation of IBDV field strains has been investigated, during the last years, especially in boiler chickens and less investigated in egg-table rearing pullets. This study reports the results of a survey conducted on 19 egg-table rearing pullet farms (27 flocks). None of the flocks involved in the study was affected by field outbreaks of IBD, but field strains belonging to very virulent IBDV strains group were detected in 6 tested flocks (from 4 farms) at 6 weeks of age. IBDV field strains were not detected at 12 weeks of age. Based on the results of this study, IBDV continues to be a major threat to commercial poultry, including egg-table rearing pullet farms. Along with strict biosecurity and hygiene management in poultry farms, vaccination is still necessary to control the disease.

## INTRODUZIONE

Il virus della bursite infettiva (IBDV), agente eziologico della bursite infettiva del pollo (IBD), appartiene alla Famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus* e provoca un'infezione altamente contagiosa nel pollo, soprattutto fra 3 e 6 settimane di vita (4). Possiede tropismo linfatico prediligendo come sede di infezione la borsa di Fabrizio, dove provoca una grave deplezione linfocitaria. L'importanza economica della malattia che ne consegue è legata all'azione patogena diretta del virus (in grado di provocare significativi indici di mortalità) e ai suoi effetti immunodepressivi con conseguente maggiore sensibilità dei gruppi colpiti ad infezioni secondarie e minore risposta immunitaria alle vaccinazioni. Sono stati identificati due sierotipi di IBDV, denominati 1 e 2, di cui solamente il primo è riportato come patogeno nel pollo. A questo sierotipo appartengono diverse varianti classificate da un punto di vista genomico o patogenico: tra questi sono annoverati i ceppi "classici", le varianti immunosoppressive e i ceppi "very virulent" (*vvIBDV*). Il controllo della malattia in allevamento, anche a causa dell'elevata resistenza del virus a diversi agenti chimici e fisici, si basa sulla profilassi vaccinale. Esistono diverse tipologie di presidi

immunizzanti: vaccini vivi attenuati somministrati in allevamento, ad immunocomplessi (vaccino vivo attenuato legato ad anticorpi specifici nei confronti del virus), vettori virali (Herpesvirus del tacchino – HVT) ingegnerizzati in modo da esprimere la proteina di superficie VP2 di IBDV (9). Scopo del presente lavoro è la raccolta di dati sulla circolazione di ceppi di campo di IBDV in allevamenti di pollastre future ovaiole da consumo sottoposti a differenti programmi vaccinali.

## **MATERIALI E METODI**

### *Gruppi oggetto dello studio e campionamento*

Lo studio è stato condotto tra maggio e settembre del 2019 e ha riguardato un totale di 19 allevamenti di pollastre (dei quali 17 in Emilia Romagna, 1 in Veneto e 1 nelle Marche) future galline ovaiole da consumo. I campionamenti sono stati effettuati a 1 giorno di vita (15 pulcini/gruppo), a 6 e a 12 settimane di età (10 soggetti/gruppo). Da 7 allevamenti sono stati campionati più gruppi a causa della presenza, nello stesso allevamento, di linee genetiche diverse. In sede di prelievo sono state raccolte informazioni anamnestiche quali: il numero di animali presenti in allevamento e nei singoli capannoni sottoposti a campionamento, la tipologia di allevamento (ad esempio in gabbia o a terra), le linee genetiche allevate, gli indici di mortalità e i programmi vaccinali nei confronti di IBDV. I soggetti di un giorno di vita sono stati sottoposti a prelievo di sangue per la valutazione dell'immunità materna; gli animali di 6 e 12 settimane di età sono stati soppressi per dislocazione cervicale e sottoposti all'esame necroscopico per la valutazione di eventuali lesioni macroscopiche riferibili a IBD e per il prelievo delle borse di Fabrizio da sottoporre alla ricerca del virus mediante RT-PCR. Nei gruppi considerati dallo studio è stato inoltre condotto un regolare monitoraggio, su base clinica e anatomo-patologica, per evidenziare l'eventuale comparsa di segni clinici e di lesioni macroscopiche riferibili a IBD.

### *Estrazione dell'RNA virale ed RT – PCR*

Le borse di Fabrizio prelevate in sede necroscopica sono state sottoposte ad RT-PCR per la ricerca di IBDV. Per ogni gruppo di animali sono stati testati due pool da 5 borse di Fabrizio ciascuno, omogenati in 7 ml di *Phosphate-buffered saline* (PBS). Da questi si è proceduto con l'estrazione dell'RNA virale utilizzando il kit commerciale QIAampViral RNA® (Qiagen) seguendo le istruzioni della casa produttrice. La reazione di RT-PCR è stata eseguita secondo quanto descritto da Etteradossi et al. (3), che consente di amplificare un frammento di 516 pb del gene codificante per la VP2 di IBDV, situato nella regione ipervariabile della stessa.

### *Sequenziamento*

I prodotti della RT-PCR sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers usati per l'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500x1 (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASStar). Il confronto delle sequenze con il pannello di ceppi di riferimento utilizzati in routine e di ceppi disponibili in GenBank è stato effettuato mediante allineamento multiplo con il programma MEGA 5. I ceppi sono stati confrontati con ceppi disponibili in GenBank e con le sequenze dei ceppi vaccinali registrati in Italia.

### *Sierologia*

Per la ricerca degli anticorpi materni nei pulcini di un giorno di vita è stato impiegato un test ELISA commerciale (IDEXX IBD™- US). Il test è stato eseguito secondo le istruzioni fornite dal produttore e i risultati sono stati espressi in titolo come indicato dal produttore del test. Per la stima dell'età ottimale di vaccinazione (nei gruppi che hanno impiegato ceppi vaccinali vivi attenuati in allevamento) è stata utilizzata la metodica descritta da De Wit J.J. (la cosiddetta "Deventer formula") (2).

### **RISULTATI**

Sono state campionate 810 pollastre appartenenti a 27 gruppi differenti, per un totale di 854100 animali coinvolti nello studio. La metà dei gruppi era allevata in gabbia (=15), mentre 9 gruppi erano allevati a terra e 3 in voliera. La linea genetica più rappresentata era Lohmann Brown (=11) seguita da Hy-line Brown (=10); sono stati anche campionati gruppi di animali appartenenti alle linee genetiche Novogen (=2) Hy-line W36(=2), Tetra bianche(=1) e Tetra rosse (=1). Anche la vaccinazione nei confronti di IBDV mostra una distribuzione quasi paritaria della tipologia di vaccini impiegati: in 16 gruppi è stato somministrato un vaccino vivo "vettorizzato" a 1 giorno di vita in incubatoio (13 gruppi vaccinati con il vaccino rHVT-IBD e 3 gruppi vaccinati con il vaccino rHVT-ND-IBD); in 11 gruppi è stato invece adottato uno schema vaccinale basato sulla somministrazione di due vaccini vivi attenuati in acqua di bevanda di cui il primo di tipo "intermediate-plus" (ceppo 228E) e il secondo di tipo "intermediate" (ceppo D78). Infine, gli indici di mortalità rilevati nel periodo considerato dallo studio sono stati variabili, con valori minimi dello 0,20% fino al 5,60% ad una settimana di vita; alla dodicesima gli indici di mortalità complessivi erano compresi tra 0,38% e 6,61%. Nel periodo considerato dallo studio non sono stati osservati segni clinici e/o lesioni macroscopiche riferibili a IBD, anche nei gruppi (tre in tutto) che hanno presentato indici di mortalità superiori alla media degli altri gruppi. Dei 27 gruppi testati, 20 sono risultati positivi a IBDV mediante RT-PCR: di questi, 18 durante la sesta settimana di vita, mentre in due gruppi la positività si è confermata anche durante la dodicesima settimana. I risultati del sequenziamento hanno evidenziato la presenza di 8 ceppi con un'elevata omologia genetica nei confronti di uno dei ceppi vaccinali vivi attenuati impiegati in allevamento (228E); 6 ceppi hanno presentato una omologia genetica del 100% nei confronti della VP2 inserita nel vettore virale HVT del vaccino rHVT-IBD, mentre 6 ceppi hanno presentato la maggiore omologia genetica nei confronti del ceppo DV86, considerato uno dei ceppi prototipo dei vvIBDV. Il dettaglio dei risultati ottenuti è riportato nella tabella 1. I valori stimati dell'età ottimale di vaccinazione (sulla base dei livelli di immunità materna rilevati ad un giorno di vita) nei gruppi vaccinati con ceppi vivi attenuati in allevamento sono riportati in tabella 2.

### **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

La bursite infettiva (IBD) resta una delle patologie aviari più temibili sia a causa dell'azione diretta del virus (che può causare elevati indici di mortalità) che dei suoi effetti immunodepressivi. Il controllo della malattia si basa sull'adozione di rigorose misure igienico-sanitarie e di biosicurezza e sull'applicazione di

programmi vaccinali. L'introduzione, nel nostro paese, di differenti tipologie di vaccini nei confronti di IBDV ha determinato, soprattutto nei gruppi di pollastre future ovaiole da consumo, una certa diversificazione dei programmi vaccinali e del tipo di vaccino impiegato. Lo scopo del presente studio non era tuttavia la valutazione dell'efficacia dei piani vaccinali, ma lo studio della circolazione di ceppi di campo in gruppi di pollastre distribuiti soprattutto in Emilia Romagna. È stata scelta questa tipologia produttiva in quanto meno investigata, da questo punto di vista, rispetto al pollo da carne (5,6,7,8). I risultati dello studio hanno evidenziato la circolazione di ceppi di campo di IBDV assimilabili, su base genetica, al ceppo DV86, considerato uno dei ceppi prototipo dei vvIBDV. Pur non essendo state eseguite valutazioni sulla patogenicità dei ceppi rilevati, si può ipotizzare che i programmi vaccinali adottati nei gruppi risultati positivi ai ceppi di campo siano stati in grado di controllare la comparsa della malattia. Nei gruppi considerati non sono stati rilevati ceppi di campo appartenenti ad altri genotipi, come ad esempio il gruppo "ITA" descritto nel nostro paese in gruppi da carne (1). Per quanto riguarda la persistenza dei ceppi vaccinali nella borsa di Fabrizio, in 4/13 gruppi vaccinati con il vaccino rHVT-IBD è stata rilevata, a 6 settimane di età, una sequenza con omologia del 100% nei confronti della VP2 inserita nel ceppo vaccinale. In 2 gruppi la positività si è confermata anche a 12 settimane di età. In 8/11 gruppi vaccinati con vaccini vivi attenuati in allevamenti è stata rilevata, solo a 6 settimane di età, una sequenza fortemente correlata ad uno dei due ceppi utilizzati, il ceppo 228E. Tale riscontro confermerebbe la maggiore capacità "colonizzatrice" della borsa di Fabrizio del ceppo 228E ("intermediate-plus") rispetto al ceppo D78 ("intermediate"). Nel corso dello studio è stata condotta anche un'indagine sierologica a 1 giorno di vita e a 6 e 12 settimane di età che non viene riportata nel presente lavoro in quanto sarà oggetto di uno studio più ampio. Nel presente lavoro è stata stimata "a posteriori", sulla base dei livelli di immunità materna, l'età ottimale di somministrazione dei ceppi 228E e D78 che, com'è noto, possono risentire negativamente, e in funzione del loro grado di attenuazione, della presenza di elevati livelli di anticorpi materni. In tutti i gruppi considerati i ceppi vivi attenuati sono stati somministrati con un certo anticipo rispetto alla stima calcolata sulla base della "formula di Deventer". In questi gruppi non è stato dimostrato un "challenge" con ceppi di campo e quindi non è possibile stabilire se le tempistiche di vaccinazione decise dalle singole aziende siano state comunque efficaci. Tuttavia una maggior attenzione ai livelli anticorpali materni potrebbe risultare utile nella scelta del programma vaccinale.

In conclusione i risultati dello studio hanno evidenziato la costante circolazione di ceppi di campo di IBDV potenzialmente virulenti anche nel settore delle pollastre future ovaiole da consumo e, di conseguenza, la necessità di adottare accurati programmi vaccinali in aggiunta alle misure di profilassi igienico-sanitaria e alla biosicurezza.

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

Gruppo n.	Piano vaccinale	RT-PCR (6 settimane)	Sequenziamento <sup>1</sup> (6 settimane)	RT-PCR (12 settimane)	Sequenziamento <sup>1</sup> (12 settimane)
1	rHVT-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
2	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,4%)	NEG	//
3	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
4	228E + D78 (14gg/21gg)	NEG	//	NEG	//
5	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	NEG	//
6	rHVT-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
7	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,1%)	NEG	//
8	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,3%)	NEG	//
9	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
10	228E + D78 (17gg/26gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
11	228E + D78 (17gg/26gg)	NEG	//	NEG	//
12	228E + D78 (14gg/21gg)	NEG	//	NEG	//
13	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)
14	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,1%)	NEG	
15	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)
16	rHVT-ND-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
17	228E + D78 (15gg/28gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
18	228E + D78 (15gg/28gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
19	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,1%)	NEG	//
20	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,5%)	NEG	//
21	rHVT-ND-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
22	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
23	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
24	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,5%)	NEG	//
25	rHVT-ND-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
26	rHVT-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
27	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	NEG	//

<sup>1</sup> Viene riportato il ceppo con la più elevata omologia genetica (espressa in %) rispetto ai ceppi confrontati (GenBank e ceppi vaccinali di riferimento)

**Tabella 2.** Stima dell'età ottimale di vaccinazione nei gruppi vaccinati con ceppi 228E e D78.

Gruppo n.	Età vaccinazione 228E (gg)	Età ottimale stimata 228E (gg)		Età vaccinazione D78 (gg)	Età ottimale stimata D78 (gg)	
		75% <sup>1</sup>	90% <sup>1</sup>		75% <sup>1</sup>	90% <sup>1</sup>
2	14	24/25	29	25	35/36	40
3	14	24	26/27	25	35	37/38
4	14	27	28	21	38	39
9	14	21/22	23/24	25	32/33	34/35
10	17	25/26	27/28	26	36/37	38/39
11	17	25/26	26/27	26	36/37	37/38
12	14	24/25	25	21	35/36	36
17	15	27/28	29	28	38/39	40
18	15	24/25	27	28	35/36	38
22	14	23	24	25	34	35
23	14	25	26	25	36	37

<sup>1</sup> viene riportata l'età in cui si stima che il 75% oppure il 90% del gruppo abbia livelli di immunità materna non più in grado di interferire con i ceppi vaccinali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bonci M., Giovanardi D., Pesente P., Morandini E., Lupini C., Cecchinato M., Rossi G., Catelli E. (2013). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della bursite infettiva isolati recentemente in Italia. Atti del LII convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.136-141.
2. De Wit J.J. (2001). Gumboro disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Annual report and proceedings of COST action 839: immunosuppressive viral diseases in poultry pp.171-178. European Commission-Directorate General for research.
3. Etteradossi N., Arnauld C., Tekaia F., Toquin D., LeCoq H., Rivallan G., Guittet M., Domenech J., Van denBerg T.P., Skinner M.A. (1999). Antigenic and genetic relationships between european veryvirulent infectious bursal disease viruses and an early west african isolate. *Avian Pathology* 28:36-46.
4. Etteradossi, N. e Saif, Y.M. Infectious Bursal Disease. [aut. libro] Y.M. Saif. *Diseases of Poultry 12th Edition*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, 2008, p. 1324.
5. Lupini C., Mescolini G., Quaglia G., Silveira F., Felice V., Catelli E. (2018). Indagine di campo sulla circolazione di virus immunosoppressivi nel pollo da carne. Atti del LVII convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.135-137
6. Lupini C., Felice V., Bonci M., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Morandini E., Catelli E. (2015). Dati epidemiologici sulla circolazione in Italia del nuovo genotipo IBDV ITA. Atti del LIV convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.201-205.
7. Massi P., Fiorentini L., Barbieri I., Casadio M., Tosi G. (2014). Identificazione mediante sequenziamento genomico dei ceppi di virus della malattia di Gumboro (IBDV) isolati nel pollo da carne in Italia e in paesi esteri negli anni 2012, 2013 e 2014. Atti del LIII convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.155-167.
8. Moreno Martin A., Fallacara F., Barbieri I., Tosi G., Rivallan G., Etteradossi N., Ceruti R., Cordioli P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Diseases* 51:863-872.
9. Muller H, Mundt E., Etteradossi N., Islam M.R. (2012). Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology* 41:133-139.



# **ANALISI GENOMICA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLATI DA ORGANI PARENCHIMATOSI DI POLLI DA CARNE E GALLINE OVAIOLE CON LESIONI RICONDUCEBILI AD *AVIAN VIBRIONIC HEPATITIS/SPOTTY LIVER DISEASE***

Laconi A.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>2</sup>, Palmieri N.<sup>3</sup>, Carraro L.<sup>1</sup>, Tonon E.<sup>2</sup>, Franch R.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>2</sup>, Piccirillo A.<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>University Clinic for Poultry and Fish Medicine, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, 1210, Austria.

## **Summary**

*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* have commonly been considered harmless commensal inhabitants of the chicken gut; however, these *Campylobacter* spp. are known to be able to multiply in the gut and invade other tissues, negatively affecting host health and performance. In this study, fourteen *Campylobacter* spp. were isolated from chickens showing foci of necrosis on the liver surface resembling lesions observed in cases of avian vibronic hepatitis/spotty liver disease. Whole genome sequences of the fourteen isolates were analysed and their virulomes compared to those of *Campylobacter* reference sequences, aiming to investigate the possible association between virulence genes and the observed disease. Nine *C. jejuni* and five *C. coli* were studied. These *Campylobacter* shared twelve virulence factors with other isolates originated from chicken livers and proved to host a higher number of virulence-associated genes in comparison to the reference genomes, including genes encoding for factors involved in adherence to and invasion of the intestinal epithelial cells. Our findings seem to point out that these twelve common virulence-associated genes, together with the presence of a high number of virulence factors involved in adherence, invasion and motility, might be responsible for the extra-intestinal spreading of our isolates and the colonization of parenchymatous tissues, resulting in the development of the disease.

## **INTRODUZIONE**

*Campylobacter* termofili, in particolare *C. jejuni* e *C. coli*, sono batteri ben adattati alle specie aviari in cui colonizzano il tratto gastroenterico, frequentemente senza causare malattia (Sahin et al., 2017). Tuttavia, diversi studi riportano come anche nelle specie aviari *Campylobacter* termofili siano in grado di lasciare l'intestino, invadendo e danneggiando la mucosa intestinale e conseguentemente di colonizzare organi parenchimatosi, tra cui il fegato (Sanyal et al., 1984; Van Deun et al., 2007). L'abilità di *C. jejuni* e *C. coli* di colonizzare il fegato del pollo pone dei dubbi rispetto al concetto che vede *Campylobacter* quale commensale in questa specie e, al tempo stesso, solleva interrogativi di sicurezza alimentare legati a casi di campilobatteriosi umana riconducibile al consumo di fegato di pollo (Cox et al., 2007; Crawshaw et al., 2015; Jennings et al., 2011; O'Leary et al., 2009). *C.*

*jejuni* è stato isolato da fegato di polli affetti da Epatite vibriónica aviaria (AVH), una condizione caratterizzata da inspessimento e opacizzazione della glissoniana e incostante presenza di flebili lesioni necrotiche multifocali disseminate, associata ad un calo nella produzione di uova di circa il 10-25% e a un aumento della mortalità che può raggiungere il 15% (Crawshaw & Young, 2003; Grimes & Reece, 2011; Hofstad et al., 1958; Sevoian et al., 1958). Tuttavia, non è stato possibile riprodurre sperimentalmente la malattia impiegando ceppi di *C. jejuni* derivati dal pollame (Jennings et al., 2011), suggerendo che tale microorganismo possa causare AVH solo in presenza di fattori predisponenti (es. condizioni di stabulazione sfavorevoli, stress, stati d'immunodepressione dell'ospite, ecc). Una condizione simile all'AVH, chiamata *Spotty liver disease* (SLD), è comparsa a partire dagli anni 2000 (Crawshaw & Young, 2003). Una nuova specie di *Campylobacter* termofilo, denominato *C. hepaticus* (Crawshaw et al., 2015; Van et al., 2016), è stato isolato da focolai di SLD e si è dimostrato in grado di riprodurre la malattia in studi d'infezione sperimentale, causando le classiche lesioni macroscopiche e microscopiche osservate in casi di SLD (Crawshaw et al., 2015; Van et al., 2017). Nel presente studio, riportiamo la caratterizzazione molecolare dell'intero genoma di nove isolati di *C. jejuni* e cinque isolati di *C. coli* ottenuti da fegato e milza di polli da carne, galline ovaiole e capponi che mostravano lesioni macroscopiche simili a quelle riscontrate in casi di AVH / SLD. In particolare, mediante un'analisi genomica comparativa dei quattordici isolati, dieci ceppi di riferimento di *C. jejuni*, dieci di *C. coli* e uno di *C. hepaticus*, è stata investigata la presenza di fattori di virulenza potenzialmente associati alla malattia osservata.

## MATERIALI E METODI

### *Campioni*

I quattordici ceppi di *Campylobacter* analizzati nel presente studio sono stati isolati presso la sezione di Treviso dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), fra il 2013 ed il 2017 da episodi di malattia riconducibile ad AVH/SLD verificatisi in allevamenti commerciali di polli da carne e galline ovaiole e capponi (Piccirillo et al., 2018). L'identificazione di specie è stata eseguita sia tramite MALDI-TOF MS che end-point multiplex PCR; nove campioni sono risultati *C. jejuni* e cinque *C. coli*, mentre nessun isolato è stato identificato come *C. hepaticus* (Piccirillo et al., 2018).

### *Sequenziamento del genoma completo degli isolati tramite next generation sequencing*

Il DNA genomico (gDNA) è stato estratto da singole colonie pure utilizzando il *MiniKit Invisorb Spin tissue* (Strattec Molecular GmbH, Birkenfeld, Germania). Le librerie sono state costruite utilizzando 1 ng di gDNA con il kit *Nextera XT* (Illumina, Inc., San Diego, CA) e sequenziate presso la Macrogen (Corea) utilizzando la piattaforma *NextSeq 500* (Illumina) che genera sequenze paired-end da 150 bp.

### *Assemblaggio delle sequenze e annotazione dei genomi*

Le sequenze grezze sono state assemblate utilizzando il software *St. Petersburg genome assembler* (SPAdes) v. 3.11.1 (impostazioni, dimensioni k-mer 21, 33, 55 e 77), mentre il software *Quality Assessment Tool for Genome Assemblies*

(QUAST) è stato utilizzato per determinare la qualità dell'assemblaggio del genoma. L'annotazione dei genomi è stata effettuata utilizzando il server RAST (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>).

#### *Caratterizzazione dei genomi ed analisi filogenetica degli isolati*

Il *sequence type* (ST), basato su sette loci, e il *core genome sequence type* (cgST), basato su 1.343 loci, sono stati determinati utilizzando il server PubMLST (<https://pubmlst.org/campylobacter/>). Per l'analisi filogenetica, 143 sequenze di *C. jejuni* caratterizzate da genomi con un singolo cromosoma completo sono state scaricate dal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), insieme a tutte le sequenze genomiche disponibili di *C. coli* (n = 29), al genoma del ceppo *C. hepaticus* HV10 (accesso NZ\_CP031611), nonché al genoma di un ceppo di *C. rectus* (accession GCA\_003859865.1), che essendo geneticamente distante dalle altre tre specie è stato incluso nell'analisi come *outgroup*. L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando il pacchetto *Microbial Genomics Module* all'interno del software *CLC Genomics Workbench 12* (<https://digitalinsights.qiagen.com>), mentre l'albero filogenetico è stato visualizzato usando il software *Interactive Tree of Life* (iTOL) (<https://itol.embl.de/itol.cgi>).

#### *Analisi comparativa dei genomi*

Il viruloma dei ceppi inclusi nello studio, è stato comparato con quello di dieci ceppi di riferimento di *C. jejuni*, dieci ceppi di riferimento di *C. coli*, selezionati sulla base dell'analisi filogenetica, e con quello del ceppo di riferimento di *C. hepaticus* HV10. La presenza di fattori di virulenza nei quattordici isolati e nei ceppi di riferimento è stata valutata utilizzando due *web-tool*, il *Bacterial Whole Genome Sequence Typing Database* (BacWGSTdb) (<http://bacdb.org/BacWGSTdb>) e il *Virulence Factor Database* (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>). Nelle analisi successive sono stati considerati solo i geni di virulenza identificati da entrambi gli strumenti web. Per indagare il potenziale genetico dei nostri isolati nel causare la malattia osservata, i ceppi oggetto del presente studio e i ceppi di riferimento sono stati clusterizzati sulla frequenza di ciascun gene di virulenza, valutato come dato binario (presente = 1, assente = 0), utilizzando il software *pHeatmap* v. 1.0.12 in R v. 3.6.3 (<https://www.r-project.org/>). Inoltre, *one way analysis of variance* (ANOVA) con il test *post hoc di Tukey* è stata utilizzata per confrontare le differenze nel numero medio di geni di virulenza tra isolati e ceppi di riferimento, utilizzando *GraphPad Prism 8.4.0* (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Infine, per investigare un possibile collegamento tra geni specifici e la malattia osservata, si è valutata la presenza di geni presenti in tutti gli isolati e nei soli ceppi di riferimento isolati da fegato di pollo, nonché di geni presenti unicamente nei nostri isolati ed assenti nei genomi di riferimento.

## **RISULTATI**

Tra i quattordici isolati sono stati identificati dodici diversi ST, di cui sette per *C. jejuni* (ST 354, 400, 880, 2116, 2274, 2314 e 2863) e cinque per *C. coli* (ST 855, 892, 1585, 4743 e 10568). Cinque ST per *C. jejuni* sono stati assegnati a tre complessi clonali (CC) 353, 354 e 1034, mentre due (ST 880 e 2274) appartenevano a CC non definiti. Tre ST identificati per *C. coli* sono stati assegnati al CC 828,

mentre il resto apparteneva a CC non definiti. Sono stati inoltre riconosciuti tredici diversi profili cgMLST, con solo due isolati di *C. jejuni* (Ca\_11 e Ca\_17) che condividono lo stesso cgST. I dettagli sono riportati in Tabella 1. L'analisi filogenetica ha evidenziato un'ampia diversità tra i nostri isolati, essendo sparsi in tutto l'albero e raggruppandosi con sequenze di *Campylobacter* sia di origine avicola che umana (Figura 1). Inoltre, solo uno degli isolati (Ca\_18) clusterizzava con uno dei ceppi isolati da fegato di pollo inclusi nell'analisi. Un numero maggiore di geni di virulenza è stato osservato nei nostri isolati rispetto ai genomi di riferimento delle rispettive specie e per *C. jejuni* la differenza era significativa ( $p = 0,000001$ ); dato confermato anche dalla clusterizzazione sulla base della frequenza dei geni di virulenza, in quanto era presente una netta separazione tra i nostri isolati ed i ceppi di riferimento (Figura 2). In dettaglio, i quattordici isolati presentavano un numero maggiore di geni codificanti per proteine coinvolte nei processi di mobilità, adesione ed invasione delle cellule epiteliali rispetto ai genomi di riferimento. Inoltre, sono stati identificati dodici geni di virulenza, coinvolti nei processi di motilità e adesione (*flgI*, *flgR*, *fliF*, *fliG*, *fliM*, *mreB*, *pglJ*, *pgp* e *rpoN*), biosintesi della capsula batterica (*kpsD* e *waaF*) e chemiotassi (*cheV*), comuni ai nostri isolati e ai ceppi di riferimento isolati da fegato di pollo. Infine, l'analisi comparativa ha evidenziato la presenza di sette geni in tutti i nostri isolati ed assenti nei genomi di riferimento codificanti per tossine (*cdtC*) e fattori coinvolti nei processi di chemiotassi (*cheW*), motilità (*fliE*, *fliN* e *flgB*), invasione (*fliQ*) e aderenza alle cellule epiteliali (*pglD*).

## DISCUSSIONE

L'analisi comparativa del viruloma effettuata nel presente studio ha rivelato che i quattordici isolati ottenuti da organi parenchimatosi di polli da carne e galline ovaiole con lesioni comparabili a quelle osservate in casi di AVH/SLD, non solo condividevano diversi fattori di virulenza coinvolti nei processi di motilità e di adesione alle cellule epiteliali con altri *Campylobacter* isolati da fegato di pollo, ma possedevano anche un numero maggiore di geni di virulenza coinvolti nei processi di adesione ed invasione delle cellule epiteliali intestinali rispetto ai genomi di riferimento, suggerendo che questi fattori potrebbero essere coinvolti nella diffusione extra-intestinale e, in determinate condizioni, nello sviluppo della patologia osservata. È infatti noto che l'adesione e l'invasione alle cellule epiteliali dell'intestino siano essenziali per la colonizzazione di altri organi (Hermans et al., 2011). Nel presente studio sono stati investigati unicamente i fattori genetici che potrebbero favorire la diffusione extra-intestinale di *Campylobacter*, tuttavia fattori ambientali e fattori predisponenti dell'ospite potrebbero contribuire non solo alla colonizzazione di altri organi da parte di *C. jejuni* e *C. coli*, ma anche allo sviluppo della patologia osservata. Infatti, *C. jejuni* è stato isolato sia da fegati apparentemente sani, che da organi caratterizzati da foci di necrosi (Cox et al., 2007; Jennings et al., 2011). L'infezione sperimentale con *C. jejuni* isolati da organi caratterizzati da lesioni simili a AVH/SLD non è stata possibile, tuttavia è stato osservato un significativo aumento di linfociti-T negli animali infetti rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che la risposta cellulo-mediata nelle fasi iniziali di infezione possa giocare un ruolo fondamentale nel prevenire lo sviluppo della malattia (Jennings et al., 2011). Diversi studi hanno dimostrato come fattori di stress ambientali possano influenzare la risposta immunitaria nelle specie avicole (Kout-

sos & Klasing, 2014; Niu et al., 2009), perciò è possibile che, a seguito di eventi in grado di ridurre la risposta immunitaria dell'ospite, la colonizzazione del fegato da parte di *C. jejuni* e *C. coli* possa portare ad una patologia simile a AVH/SLD. Oltre all'impatto sulla produzione avicola, la diffusione extra-intestinale di *Campylobacter* termofili rappresenta anche un possibile rischio per la salute pubblica legato al consumo di fegato di pollo: infatti, *C. jejuni* e *C. coli* presenti nel tessuto profondo del fegato hanno meno probabilità di essere distrutti durante il processo di cottura rispetto a quelli presenti sulla superficie a causa della contaminazione al macello durante la manipolazione della carcassa (Blankenship & Craven, 1982; Skelly & Weinstein, 2003).

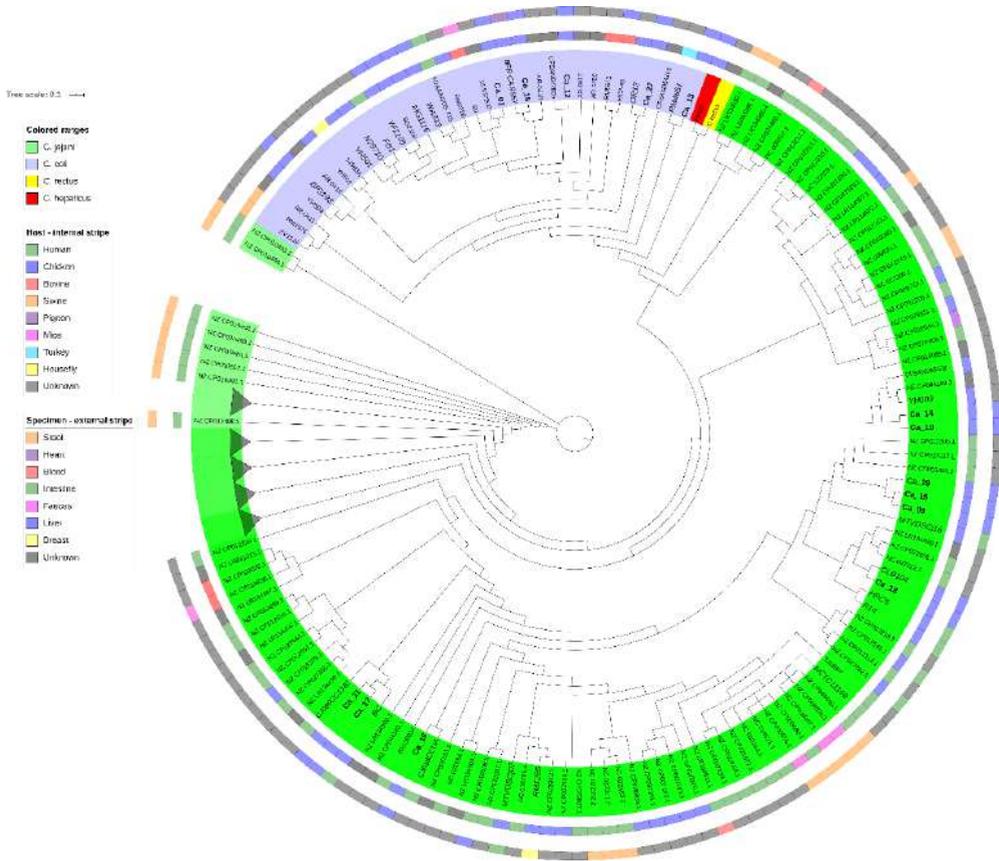
## **CONCLUSIONI**

Il presente studio riporta l'associazione tra *C. jejuni* e *C. coli* e casi sporadici di malattia simile a AVH / SLD. L'analisi comparativa del viruloma ha evidenziato come la presenza di un numero elevato di geni legati a processi di motilità, adesione ed invasione delle cellule epiteliali dell'intestino e di geni di virulenza comuni tra *Campylobacter* termofili potrebbe essere collegata alla diffusione extra-intestinale e allo sviluppo della malattia. Tuttavia, fattori predisponenti sembrano essere coinvolti sia nella diffusione extra-intestinale, che nello sviluppo della malattia e studi futuri dovrebbero puntare a chiarire il loro coinvolgimento soprattutto per le possibili implicazioni nell'ambito della salute pubblica.

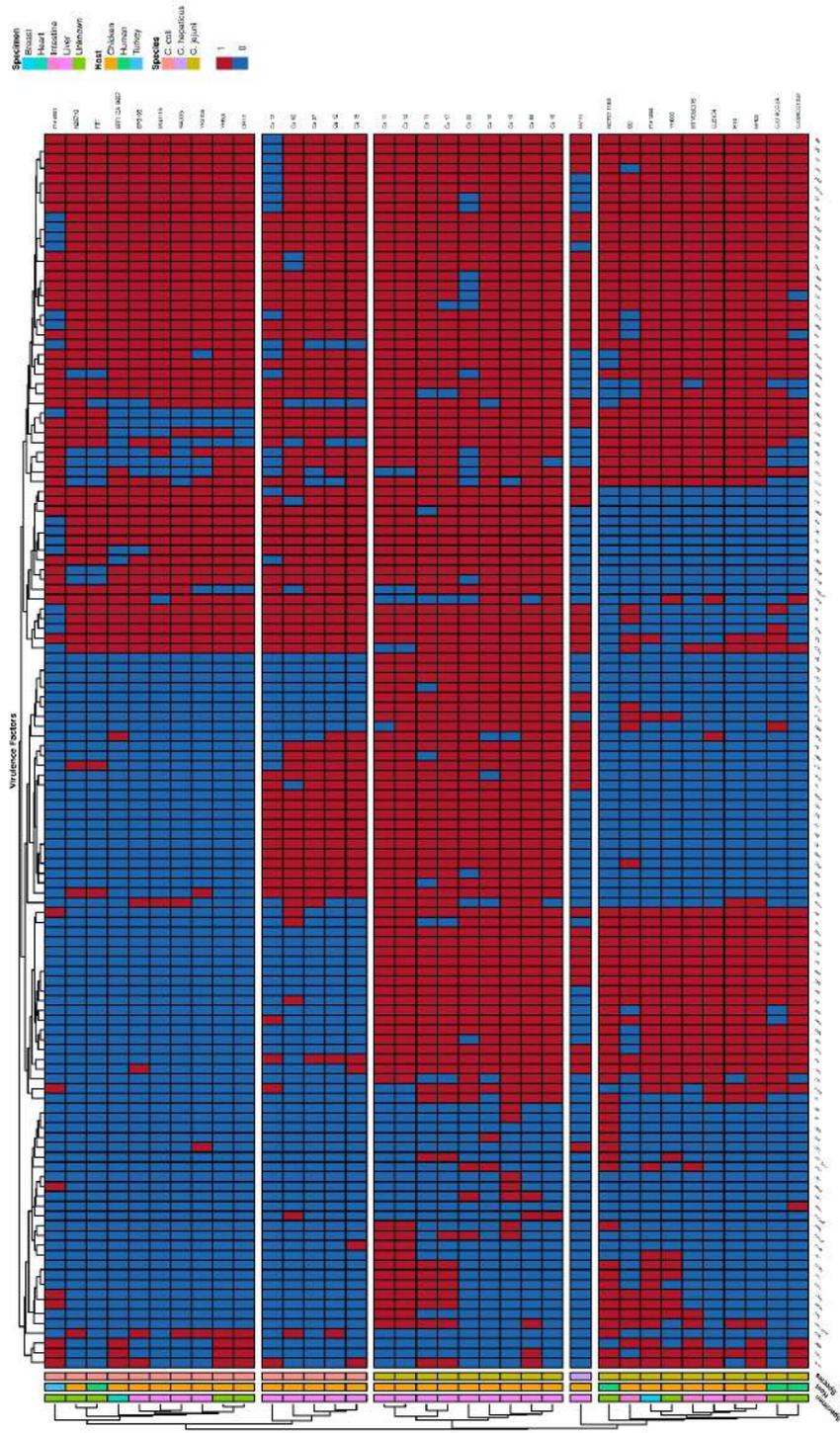
**Tabella 1.** Ceppi di *Campylobacter* spp. isolati da organi parenchimatosi di polli da carne e galline ovaiole, fra il 2013 e il 2017.

ID	Campylobacter spp.	Ospite	Organo	Anno di isolamento	Lunghezza del genoma (bp)	Contenuto in GC (%)	No. di contig (RAST)	No. CDSs by RAST	No. Di sottostemi by RAST	Profilo MLST	Complesso clonale	Profilo egMLST
Ca_02	<i>C. coli</i>	Broiler	Milza	2014	1686970	31.4	49	1706	308	855	828	2588
Ca_09	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2017	1791945	30.3	170	1837	314	2274	none	22427
Ca_10	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2017	1750803	30.4	107	1792	316	400	353	19976
Ca_11	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2014	1620028	30.4	32	1638	304	2314	1034	19802
Ca_12	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2014	1812298	31.8	855	1777	313	892	828	14599
Ca_13	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2017	1706006	31.5	481	1735	290	10568	none	10311
Ca_14	<i>C. jejuni</i>	Capon	Fegato	2014	1742800	30.3	86	1784	316	400	353	20526
Ca_15	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2014	1717817	31.6	298	1733	312	1585	828	14352
Ca_16	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2013	1793191	30.3	224	1842	309	880	none	1308
Ca_17	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2014	1628806	30.5	120	1641	303	2314	1034	19802
Ca_18	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2014	1714209	30.4	96	1754	310	354	354	4713
Ca_19	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2016	1750423	30.2	109	1777	313	2863	354	12198
Ca_27	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2015	1859882	31.1	66	1933	315	4743	none	15992
Ca_29	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2016	1630894	30.5	267	1660	293	2116	353	23115

**Figura 1.** Albero filogenetico circolare delle sequenze dei genomi di *Campylobacter* spp.. *C. jejuni* sono evidenziati in verde, *C. coli* in viola e *C. hepaticus* HV10 in rosso. Gli isolati identificati nel presente studio sono riportati in grassetto, mentre i genomi di riferimento inclusi nelle analisi comparative sono evidenziati in corsivo. I clades che rappresentano isolati di *C. jejuni* ottenuti da feci umane sono stati collasati per facilitare la lettura dell'albero.



**Figura 2.** Analisi di *clustering* dei ceppi di *Campylobacter* spp. (n = 35) sulla base della presenza/assenza dei geni di virulenza variabili (n = 126). Rosso indica la presenza del gene, blu indica l'assenza.



## BIBLIOGRAFIA

1. Blankenship, L. C., & Craven, S. E. (1982). *Campylobacter jejuni* survival in chicken meat as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 88 LP – 92. <http://aem.asm.org/content/44/1/88.abstract>
2. Cox, N. A., Richardson, L. J., Buhr, R. J., Northcutt, J. K., Bailey, J. S., Cray, P. F., & Hiatt, K. L. (2007). Recovery of *Campylobacter* and *Salmonella* Serovars From the Spleen , Liver and Gallbladder , and Ceca of Six- and Eight-Week-Old Commercial Broilers. *Poultry Science*, 16(4), 477–480. <https://doi.org/10.3382/japr.2006-00123>
3. Crawshaw, T. R., Chanter, J. I., Young, S. C. L., Cawthraw, S., Whatmore, A. M., Koylass, M. S., Vidal, A. B., Salguero, F. J., & Irvine, R. M. (2015). Isolation of a novel thermophilic *Campylobacter* from cases of spotty liver disease in laying hens and experimental reproduction of infection and microscopic pathology. ., 179(3–4), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.008>
4. Crawshaw, T., & Young, S. (2003). Increased mortality on a free-range layer site. In *The Veterinary record* (Vol. 153, Issue 21, p. 664).
5. Grimes, T., & Reece, R. (2011). Spotty liver disease—an emerging disease in free-ranging layers in Australia. *Proceedings of the Sixtieth Western Poultry Disease Conference*, 53–56.
6. Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*, 42(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-82>
7. Hofstad, M. S., McGehee, E. H., & Bennett, P. C. (1958). Avian Infectious Hepatitis. *Avian Diseases*, 2(3), 358–364. <https://doi.org/10.2307/1587535>
8. Jennings, J. L., Sait, L. C., Perrett, C. A., Foster, C., Williams, L. K., Humphrey, T. J., & Cogan, T. A. (2011). *Campylobacter jejuni* is associated with , but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.005>
9. Koutsos, E. A., & Klasing, K. C. (2014). Chapter 17 - Factors Modulating the Avian Immune System. In K. A. Schat, B. Kaspers, & P. Kaiser (Eds.), *Avian Immunology (Second Edition)* (Second Edi, pp. 299–313). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00017-0>
10. Niu, Z. Y., Liu, F. Z., Yan, Q. L., & Li, W. C. (2009). Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Science*, 88(10), 2101–2107. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00220>
11. O’Leary, M. C., Harding, O., Fisher, L., & Cowden, J. (2009). A continuous common-source outbreak of campylobacteriosis associated with changes to the preparation of chicken liver pâté. *Epidemiology and Infection*, 137(3), 383–388. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001003>
12. Piccirillo, A., Zandonà, L., Carraro, L., Apostolakos, I., Bano, L., Università, V., & Pd, L. (2018). Identificazione di ceppi di *Campylobacter* spp . isolati da episodi di Epatite Vibronica Aviare ( AVH ) / Spotty Liver Disease ( SLD ) del broiler e della gallina ovaioia. *Atti Della Società Italiana Di Patologia Aviare 2018: LVII Convegno Annuale e III Simposio Scientifico, Parma, 14 Settembre 2018.*, 161–166.

13. Sahin, O., Terhorst, S. A., Burrough, E. R., Shen, Z., Wu, Z., Dai, L., Tang, Y., Plummer, P. J., Ji, J., Yaeger, M. J., & Zhang, Q. (2017). Key role of capsular polysaccharide in the induction of systemic infection and abortion by hypervirulent *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 85(6), 1–15. <https://doi.org/10.1128/IAI.00001-17>
14. Sanyal, S. C., Islam, K. M. N., Neogy, P. K. B., Islam, M., Speelman, P., & Huq, M. I. (1984). *Campylobacter jejuni* Diarrhea Model in Infant Chickens. 43(3), 931–936.
15. Sevoian, M., Winterfield, R. W., & Goldman, C. L. (1958). Avian Infectious Hepatitis. I. Clinical and Pathological Manifestations. *Avian Diseases*, 2(1), 3–18. <https://doi.org/10.2307/1587509>
16. Skelly, C., & Weinstein, P. (2003). *Review Pathogen Survival Trajectories : An Eco-Environmental Approach to the Modeling of Human Campylobacteriosis Ecology*. 111(1), 19–28. <https://doi.org/10.1289/ehp.5312>
17. Van Deun, K., Haesebrouck, F., Heyndrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., Dumez, L., Messens, W., Leleu, S., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., & Pasmans, F. (2007). Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1284–1289. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47342-0>
18. Van, T. T. H., Elshagmani, E., Gor, M. C., Anwar, A., Scott, P. C., & Moore, R. J. (2017). Induction of spotty liver disease in layer hens by infection with *Campylobacter hepaticus*. *Veterinary Microbiology*, 199, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.033>
19. Van, T. T. H., Elshagmani, E., Gor, M. C., Scott, P. C., & Moore, R. J. (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4518–4524. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001383>

# VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DELLA FERTILIZZAZIONE CON POL-LINA DI ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE SULLE COMUNITÀ MI-CROBICHE E SU GENI DI RESISTENZA DI TERRENI AGRICOLI

Laconi A.<sup>1</sup>, Tolosi R. <sup>1</sup>, Grilli G.<sup>2</sup>, Trocino A.<sup>1</sup>, Carraro L.<sup>1</sup>, Di Cesare F.<sup>3</sup>, Cagnardi P.<sup>2</sup>, Piccirillo A.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano;

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano.

## Summary

Antimicrobials are commonly used in conventional livestock production, and live-stock waste in the form of manure is widely applied to agricultural lands as fertilizer. This practice raises questions regarding the effects of fertilization on (i) soil mi-crobiota composition and (ii) spread of antimicrobials and antimicrobial resistance (AMR) in the environment. This study aimed at assessing the impact of poultry manure application on soil microbiome, antimicrobial concentrations and AMR gene abundance. We found the microbial community composition in manure to be differ-ent and less diverse than in soil, with manure application altering only marginally the soil microbiome. Exceptions were the phyla Firmicutes and Tenericutes, which en-riched in fertilized soil. Of the antimicrobials investigated, flumequine was the most abundant in both manure and soil, while no antimicrobials increased after manure application. AMR genes were more abundant in manure, with *ermB* and *blat*<sub>TEM-1</sub> being enriched after fertilization, while *mcr-1* was significantly more abundant in the soil. Positive correlation between *oqxA* abundance and flumequine concentrations was observed, together with the co-occurrence of some AMR genes and microbial taxa (e.g. *ermB* correlated with Firmicutes and Actinobacteria). This study showed that manure application has little effect on soil microbiome but may contribute to the dissemination of specific AMR genes into the environment. Moreover, flumequine residues seem to enhance the emergence of *oqxA* in soil.

## INTRODUZIONE

Il letame derivato dall'allevamento intensivo è comunemente impiegato in agricoltu-ra come fertilizzante per migliorare la qualità del suolo (Das et al., 2017) the role of different livestock composts [composted cattle manure (CCM). Tuttavia, le comunità microbiche del letame possono influenzare il microbioma del suolo, direttamente attraverso la competizione o indirettamente contribuendo alla diffusione della resi-stenza ai farmaci antimicrobici (AMR). La misura in cui il microbioma del letame influenza la comunità microbica del suolo rimane poco chiara. Infatti, sebbene alcuni studi indichino che l'applicazione del letame alteri in modo significativo il micro-bioma del suolo (Stocker et al., 2015; Zhang et al., 2020), altri hanno riportato cam-biamenti nella composizione microbica limitati a pochi taxa (Lopatto et al., 2019).

I farmaci antimicrobici sono stati ampiamente utilizzati per diversi decenni nell'allevamento intensivo, venendo eliminati come tali o come metaboliti attivi o inattivi dagli animali, mediante feci ed urine (Wei et al., 2011; Xia et al., 2019). A seguito di fertilizzazione del suolo, gli antimicrobici possono diffondersi nell'ambiente circostante, causando l'eventuale comparsa di batteri resistenti e di geni di resistenza (ARG) (Hou et al., 2015; Munk et al., 2018; Qiao et al., 2018; Rovira et al., 2019; Xia et al., 2019). La diffusione di ARG nell'ambiente rappresenta una grande preoccupazione per la salute pubblica poiché possono trasferirsi all'uomo a seguito di dispersione nei corsi d'acqua, attraverso il deflusso e il drenaggio dal suolo, o entrando nella catena alimentare (Barendonk et al., 2015; Hruby et al., 2016; Marti et al., 2014; Pruden et al., 2012). Nel presente studio, abbiamo valutato l'impatto dell'applicazione di pollina proveniente da allevamenti avicoli sulla concentrazione di antimicrobici, sulla composizione delle microbioma e sull'abbondanza dei ARG nel suolo agricolo.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Il campionamento è stato effettuato in 10 allevamenti di polli da carne situati in Lombardia (n = 8) e Veneto (n = 2) tra ottobre 2017 e marzo 2019. In ogni azienda sono stati raccolti 3 campioni : 1) pollina (1 campione), 2) suolo (1 campione prima della fertilizzazione e 1 campione un mese circa dopo la fertilizzazione), per un totale di 30 campioni. I campioni di pollina sono stati raccolti secondo quanto descritto da Kumari et al. (2015), mentre i campioni di terreno sono stati raccolti seguendo il protocollo di Dong et al. (2014).

### *Quantificazione degli antimicrobici*

Il metodo analitico è stato messo a punto per rilevare e quantificare 14 diversi antimicrobici: amoxicillina, ampicillina, cefquinome, ceftiofur, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, flumechina, marbofloxacina, eritromicina, spiramicina, tilmicosina, tilososina e colistina. La purificazione dei campioni è stata eseguita come descritto in precedenza (Chiesa et al., 2018). L'analisi in spettrometria di massa (MS) è stata eseguita su un TSQ Quantum MS a triplo quadrupolo (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) dotato di un'interfaccia elettrospray (ESI) impostata nella modalità di ionizzazione elettrospray positiva (ESI+) (Chiesa et al., 2018) ed il metodo è stato validato secondo i criteri della Decisione 2002/657/CE (European commission, 2002). Per ogni analita, le prestazioni del metodo sono state valutate mediante la determinazione del tempo di ritenzione (RT). I rapporti degli ioni di transizione, il recupero, l'accuratezza (esattezza), la precisione (espressa come ripetibilità intra- e inter-giornaliera), la linearità, nonché il limite di decisione ( $CC\alpha$ ) e la capacità di rilevamento ( $CC\beta$ ) sono stati calcolati come descritto nel documento SANCO / 2004/2726 rev. 4 (European Union, 2008).

### *Estrazione degli acidi nucleici*

Venticinque grammi di campione (pollina o terreno) sono stati posti in una sacca filtrante sterile (dimensione dei pori di 280  $\mu$ m), a cui sono stati aggiunti 25 ml di PBS e miscelati a mano per 1 min. Il liquido filtrato è stato centrifugato a 4,000 rpm per 10 min a 4 °C; il DNA è stato estratto da 250 mg del pellet risultante, utilizzando il kit DNeasyPowerSoil (Qiagen, Hilden, Germania) seguendo le istruzioni del produttore.

La qualità e la quantità del DNA sono state valutate utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis NanoDropND-1000 (NanodropTechnologies, Wilmington, DE, Stati Uniti).

#### *Amplificazione, sequenziamento ed analisi delle comunità microbiche*

Per valutare le differenze nelle comunità batteriche tra pollina, suoli fertilizzati e non, le regioni V3-V4 del gene ribosomiale 16S sono state amplificate utilizzando l'enzima Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) ed i primer 341F / R806 (Takahashi et al., 2014) modificati con *overhangs* per aggiungere gli adattatori per gli indici. I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit SPRIselect (Beckman Coulter, Brea, CA) e i codici a barre specifici sono stati introdotti tramite una seconda PCR (Milan et al., 2018). A seguito di uno *step* di purificazione, le librerie sono state quantificate mediante Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, Monza, Italia) e poolate. La concentrazione e l'integrità del DNA nel pool sono state valutate tramite Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Stati Uniti), quindi sequenziate utilizzando la piattaforma MiSeq Illumina (San Diego, California, USA) che genera sequenze *paired-end* da  $2 \times 300$  bp. Il pacchetto DADA2 all'interno del software *Quantitative Insights into Microbial Ecology 2* (QIIME2 versione 2019.4) è stato utilizzato per l'analisi dei dati dell'rRNA 16S (Bolyen et al., 2019; Callahan et al., 2016), mentre il *software* Calypso (<http://cgenome.net/wiki/index.php/Calypso>) è stato utilizzato per la caratterizzazione delle comunità microbiche e la  $\alpha$ - e  $\beta$ -diversity (Zakrzewski et al., 2017). La composizione delle comunità microbiche è stata visualizzata utilizzando *heatmap* con il *software* *pHeatmap* v. 1.0.12 in R v. 3.6.3 (<https://www.r-project.org/>). Per quantificare la diversità del microbioma all'interno di ciascuna tipologia di campione ( $\alpha$ -diversity), sono stati utilizzati l'indice di Shannon ed il metodo Chao1. Per valutare le differenze complessive nella composizione delle comunità microbiche delle 3 tipologie di campione ( $\beta$ -diversity) è stata effettuata l'analisi della varianza multivariabile permutazionale (PERMANOVA), mentre per la visualizzazione sono stati utilizzati i grafici dell'analisi delle coordinate principali (PCoA) e il ridimensionamento multidimensionale non metrico (NMDS).

#### *Analisi dei geni di resistenza agli antimicrobici mediante PCR quantitativa (qPCR)*

Per rilevare la presenza e l'abbondanza relativa di 20 geni di resistenza sono stati utilizzati saggi di qPCR gene-specifici. Gli ARG analizzati erano i seguenti: *ermA*, *ermB*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1like</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM-2</sub>* and *bla<sub>NDM</sub>*. Tutti i saggi sono stati eseguiti in un volume finale di 10  $\mu$ l utilizzando il kit PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) con concentrazione ottimale di ciascun *primer* (600 / 600nM), la piattaforma LightCycler®480 Roche (Roche, Basilea, Svizzera) ed applicando il seguente ciclo di amplificazione: incubazione iniziale a 50 °C per 2 min, seguita da 2 min a 95 °C e da 45 cicli a 95 °C per 10 sec e 50-60 °C per 40 sec. Le curve di *melting* (tra 40 ° e 95 ° C) sono state determinate aggiungendo una fase di dissociazione dopo l'ultimo ciclo di amplificazione a una velocità di transizione della temperatura di 4,4 °C / sec. I *primer* sono riportati in tabella 1. L'abbondanza assoluta dei geni di resistenza è stata calcolata sulla base di curve *standard* ottenute utilizzando quantità note di DNA *target*. Tuttavia, l'abbondanza assoluta in un dato campione non è un valore significativo, poiché è proporzionale al DNA totale presente nel campione; quindi, l'abbondanza relativa degli ARG è stata calcolata normalizzando il numero di

copie degli ARG sul numero di copie del gene 16S rRNA.

### *Analisi statistica*

Le differenze nella prevalenza di ARG (presenza / assenza) tra i tipi di campioni (pollina, terreno prima e un mese dopo la fertilizzazione) sono state valutate utilizzando modelli lineari generalizzati (GLM), mentre le differenze nell'abbondanza dei geni sono state confrontate utilizzando il test di Kruskal-Wallis con il test di Dunn per confronti multipli. Le differenze nei residui di antimicrobici rispetto ai tipi di campioni sono state testate utilizzando la regressione di Tobit sulle concentrazioni di residui trasformate in log. Per valutare l'associazione tra l'abbondanza relativa dei ARG con la concentrazione di residui di antimicrobici e con l'abbondanza relativa di taxa microbici a livello di phylum è stata utilizzata l'analisi di correlazione di Spearman. L'analisi statistica e la visualizzazione dei dati sono state eseguite in R (versione 3.6.3) (<https://www.r-project.org/>).

## **RISULTATI**

Dei 30 campioni analizzati, 16 sono risultati positivi ad almeno un antimicrobico, mentre dei 14 antimicrobici ricercati solo 5 sono stati identificati in almeno un campione. L'antimicrobico caratterizzato dalla prevalenza maggiore è risultato essere la flumechina (16/30; 53,33% sul totale dei campioni), seguita da enrofloxacin (3/30; 10%), tilosina (2/30; 6,67%), ampicillina e ciprofloxacina (1/30; 3,33%). Flumechina ed enrofloxacin sono state identificate sia nella pollina che nel terreno, mentre i restanti farmaci antimicrobici sono stati riscontrati solo nella pollina. La concentrazione di antimicrobici era compresa tra valori al di sotto del limite di decisione ( $CC\alpha$ ) e 379,29 ng / g (flumechina). La concentrazione media di flumechina nella pollina era di 22,34 ng / g, mentre nel suolo prima e dopo la fertilizzazione era rispettivamente di 51,72 ng / g e 53,46 ng / g e la differenza tra le diverse tipologie di campione non era significativa ( $p > 0.05$ ). Utilizzando il sequenziamento del gene 16S rRNA, è stata caratterizzata la struttura delle comunità microbiche dei campioni. A livello tassonomico di phylum, membri dei phyla Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, dominavano la composizione del microbioma della pollina; mentre i primi erano dominanti in entrambe le tipologie di terreno, si osservava un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) di batteri appartenenti al phylum Firmicutes nel terreno dopo la fertilizzazione. Diversi phyla (Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimatodes, Patescibacteria e Chloroflexi) erano più abbondanti nel terreno. A conferma della netta separazione tra le comunità microbiche di suolo e pollina, la *heatmap* prodotta a livello di phylum mostrava la presenza di due *cluster* distinti, contenenti rispettivamente la maggioranza dei campioni di terreno e tutti i campioni di pollina (Figura 1). Oltre al phylum Firmicutes, solo per Tenericutes si osservava un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) dell'abbondanza nel suolo a seguito di fertilizzazione. Entrambe le misurazioni (indice di Shannon e Chao1) hanno mostrato una  $\alpha$ -diversity significativamente ( $p < 0.05$ ) inferiore nei campioni di pollina rispetto ai campioni di terreno, sia prima che dopo la fertilizzazione (Figura 2A). Al contrario, l' $\alpha$ -diversity era simile tra i campioni di suolo prima e dopo l'applicazione della pollina (Figura 2B). L'analisi della  $\beta$ -diversity ha evidenziato come la comunità microbica nella pollina era significativamente diversa ( $p < 0.001$ ) da quella del suolo prima e dopo la fertilizzazione, mentre non vi era alcuna differenza significativa tra terreno fertilizzato e non fertilizzato, dato supportato dai grafici PCoA e NMDS (Figura 3A, B).

Dei 20 geni di resistenza analizzati, 16 sono stati identificati in almeno un campione, con l'eccezione di *qnrA*, *mcr-2*, *mcr-4* e *bla<sub>NDM</sub>*. Considerando i 30 campioni analizzati, *ermB* (93,33%), *bla<sub>TEM-1</sub>* e *bla<sub>CMY-2</sub>* (83,33%) erano gli ARG più diffusi, seguiti da *ermA* (73,33%), mentre la prevalenza degli altri geni era più bassa e variava dal 33,33% (*bla<sub>CTX-M-11IKE</sub>*) al 3,33% (*oqxB*, *bla<sub>VIM-2</sub>* e *mcr-5*). *OqxB*, *bla<sub>VIM-2</sub>* e *mcr-2* sono stati riscontrati solo nel suolo, mentre *mcr-5* era presente unicamente nella pollina. Per il solo gene *bla<sub>SHV</sub>* è stato osservato un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) del numero di campioni di terreno positivi dopo la fertilizzazione. Considerando l'abbondanza relativa complessiva dei geni di resistenza nelle 3 tipologie di campione, i campioni di terreno prima dell'applicazione della pollina presentavano un'abbondanza inferiore rispetto al suolo dopo la fertilizzazione; tale incremento sembra essere dovuto all'applicazione della pollina, in quanto in questa è stata rilevata l'abbondanza maggiore di geni di resistenza (Figura 4A). Dei 20 geni presi in considerazione, la maggior parte presentava un'abbondanza relativa simile nelle diverse tipologie di campione; tuttavia *ermB* e *bla<sub>TEM-1</sub>* non solo erano significativamente più abbondanti nella pollina rispetto al suolo prima ( $p < 0.01$ ) e dopo ( $p < 0.05$ ) la fertilizzazione, ma la loro abbondanza relativa aumentava a seguito della fertilizzazione ( $p < 0.05$ ). Inoltre *mcr-1* era significativamente più abbondante sia nel suolo che nella pollina ( $p < 0.05$ ). Sono state individuate diverse correlazioni positive tra ARG e specifici phyla. In dettaglio, sono state individuate correlazioni positive tra *ermA* e Actinobacteria (Spearman  $r = 0.453$ ,  $p < 0.05$ ), *ermB* e Actinobacteria (Spearman  $r = 0.439$ ,  $p < 0.05$ ) e Firmicutes (Spearman  $r = 0.548$ ,  $p < 0.01$ ), *oqxA* e Hydrogenedentes (Spearman  $r = 0.4282$ ,  $p < 0.05$ ), *qnrS* e Proteobacteria (Spearman  $r = 0.454$ ,  $p < 0.05$ ) e *bla<sub>TEM-1</sub>* e Tenericutes (Spearman  $r = 0.449$ ,  $p < 0.05$ ). L'analisi di correlazione tra la concentrazione di antimicrobici e l'abbondanza relativa di ARG è stata eseguita considerando solo la flumechina, poiché il basso numero di osservazioni per i rimanenti antimicrobici ha reso impossibile l'analisi. L'analisi ha rivelato una correlazione positiva tra la concentrazione di flumechina e l'abbondanza di *oqxA* (Spearman  $r = 0,380$   $p = 0.05$ ), mentre non è stata osservata alcuna correlazione né con gli altri geni che conferiscono resistenza ai (fluoro)chinoloni, né con altri geni di resistenza.

## DISCUSSIONE

Nello studio è stata riscontrata una percentuale di campioni positivi a farmaci antimicrobici pari al 53,33%, e solo 5 dei 14 antimicrobici ricercati è stato identificato. Sebbene la flumechina sia un (fluoro)chinolone di vecchia generazione è stata la molecola più rilevata, in particolare nel suolo. Ciò è in accordo con la sua capacità di persistere a lungo nel letame, dove può rimanere fino ad un anno (Berendsen et al., 2018). La composizione microbica, sia per i campioni di pollina che di suolo, è in accordo con studi precedenti; i phyla più abbondanti identificati sono quelli tipici del letame e dei microbiomi del suolo e si conferma che il microbioma della pollina è meno diversificato rispetto a quello del suolo (Chen et al., 2007; Fierer, 2017; Hamm et al., 2016; Looft et al., 2012). In accordo con osservazioni precedenti (Riber et al., 2014; Xie et al., 2018), l'applicazione della pollina ha mostrato un'influenza limitata sulla comunità microbica del suolo e non ha aumentato la sua diversità, ma piuttosto ha causato cambiamenti significativi solo in alcuni phyla. Firmicutes, che rappresenta il phylum più abbondante nella pollina, è stato arricchito nel suolo dopo la fertilizzazione come precedentemente riportato (Rieke et al., 2018). Il numero più alto di copie totali di

ARG è stato rilevato nella pollina e un aumento dell'abbondanza totale è stato osservato nel terreno dopo la fertilizzazione, in accordo con studi precedenti (Marti et al., 2014; Xia et al., 2019; Xiong et al., 2015; Zhao et al., 2017). A dispetto di un aumento globale nell'abbondanza di geni di resistenza, solo i geni *ermB* e *bla*<sub>TEM-1</sub> hanno mostrato un significativo aumento nel numero di copie nel terreno dopo la fertilizzazione. In precedenza è stato osservato come entrambi questi geni siano in grado di persistere a lungo nel suolo dopo la fertilizzazione (Graham et al., 2016; Lopatto et al., 2019). L'applicazione del letame è stata storicamente riconosciuta come la principale fonte di diffusione nell'ambiente dei geni *mcr*, che conferiscono resistenza alla colistina, un antimicrobico di importanza critica e di ultima scelta contro le infezioni umane causate da batteri Gram-negativi multi-resistenti (Xia et al., 2019). Tuttavia, nessuno dei tre geni *mcr* identificati risulta più abbondante nel terreno dopo la fertilizzazione e il gene *mcr-1* non è stato rilevato nella pollina, suggerendo che l'applicazione di quest'ultima potrebbe non essere una delle cause principali della loro diffusione nell'ambiente. Nonostante la bassa prevalenza e nonostante non si osservi un arricchimento dopo la fertilizzazione, la presenza sia nel letame che nel suolo del gene *bla*<sub>OXA-48</sub> in grado di conferire resistenza a carbapenemi, è di preoccupazione per la salute pubblica a causa dell'importanza clinica di questi farmaci come trattamento di ultima scelta in medicina umana (Nordmann et al., 2011). L'aumento della concentrazione di flumechina è stato correlato a un aumento dell'abbondanza relativa del gene *oqxA* che conferisce resistenza ai (fluoro)chinoloni, suggerendo che essa potrebbe aumentare l'accumulo di questo gene nel suolo dopo la fertilizzazione o rallentare la dispersione, come precedentemente riportato per altri (fluoro)chinoloni (Xiong et al., 2015). Anche questo dato rappresenta una preoccupazione per la salute pubblica e dovrebbe portare a riconsiderare l'uso della flumechina negli animali; infatti, *oqxA* conferisce resistenza non solo alla flumechina, che è un (fluoro)chinolone di prima generazione con uno spettro di attività limitato (Daly & Silverstein, 2009), ma anche ad altri (fluoro)chinoloni (ad esempio ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e acido nalidixico) ampiamente usati per trattare le infezioni batteriche umane (Jacoby et al., 2014; Kim et al., 2009). Infine, è interessante notare come i geni *ermB* e *bla*<sub>TEM-1</sub>, di cui si osserva un aumento del numero di copie nel suolo dopo la fertilizzazione, presentino correlazioni positive rispettivamente con i phyla Firmicutes e Tenericutes, a loro volta arricchiti a seguito dell'applicazione della pollina, suggerendo che l'aumento dell'abbondanza di questi geni nel suolo possa essere dovuta alla proliferazione di tali phyla, piuttosto che a trasferimento genico orizzontale.

## CONCLUSIONI

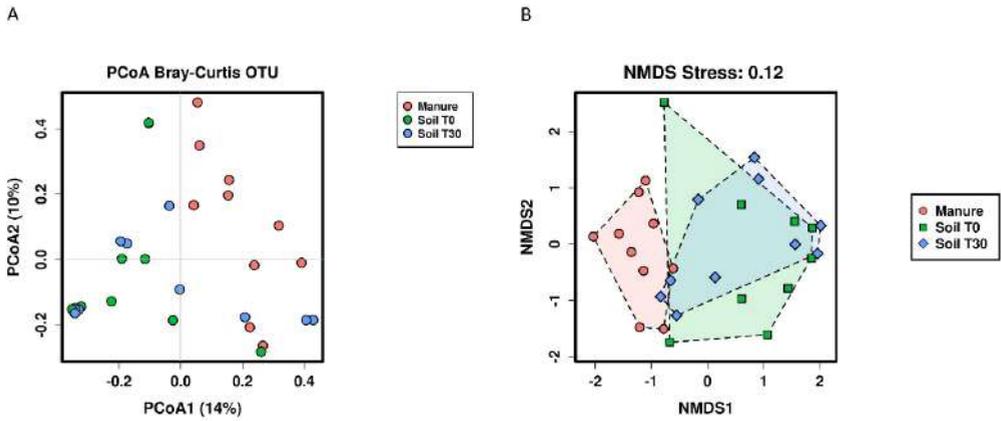
Il presente studio ha dimostrato che la maggior parte dei batteri derivanti dalla pollina non sopravvivono a lungo nel suolo e l'applicazione di questa non influisce drasticamente sul suo microbioma, poiché a 30 giorni dalla fertilizzazione solo due phyla (Firmicutes e Tenericutes) sono stati significativamente arricchiti. A fronte di un aumento globale del numero di geni di resistenza a seguito della fertilizzazione, l'abbondanza relativa di solo due geni (*ermB* e *bla*<sub>TEM-1</sub>) è aumentata significativamente e tali geni sono positivamente correlati agli unici due phyla arricchiti dopo l'applicazione della pollina. Infine, la flumechina sembra esercitare una pressione selettiva per l'accumulo di *oqxA* nel terreno fertilizzato, suggerendo che il suo uso in campo veterinario debba essere riconsiderato.

**Tabella 1.** Elenco dei *primer* utilizzati nei saggi qPCR per il rilievo dei geni di resistenza selezionati.

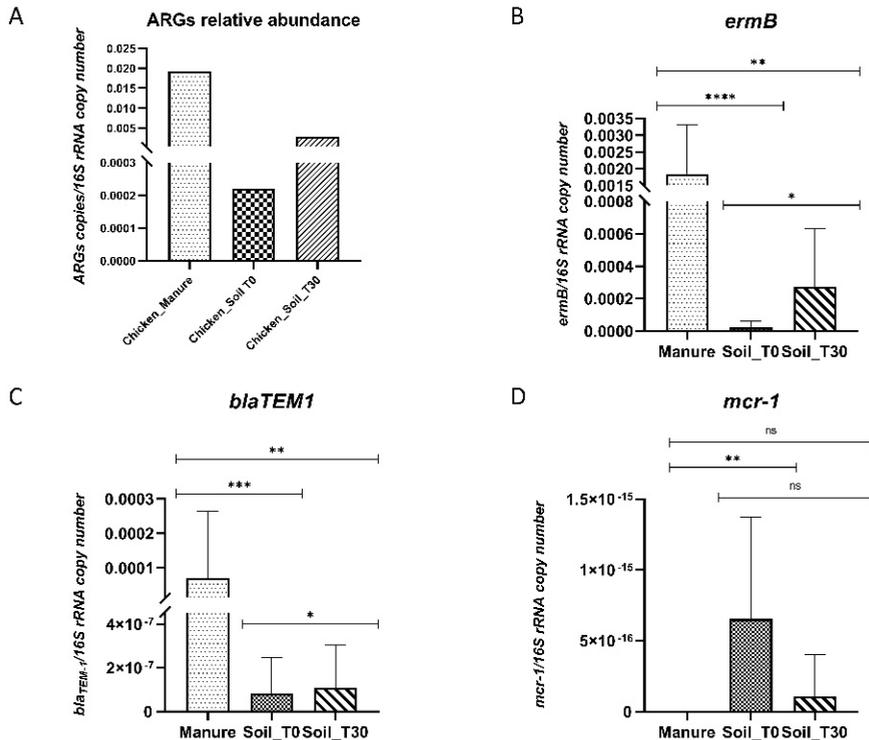
Name	Sequence (5'-->3')	Annealing temperature	Target gene
mcr1-qf	AAAGACGCGGTACAAGCAAC	60°C	<i>mcr-1</i>
mcr1-qr	GCTGAACATACACGGCACAG		
mcr2-qf	CGACCAAGCCGAGTCTAAGG	60°C	<i>mcr-2</i>
mcr2-qr	CAACTGCGACCAACACACTT		
mcr3-qf	ACCTCCAGCGTGAGATTGTTCCA	60°C	<i>mcr-3</i>
mcr3-qr	GCGGTTTCACCAACGACCAGAA		
mcr4-qf	AGAATGCCAGTCGTAACCCG	60°C	<i>mcr-4</i>
mcr4-qr	GCGAGGATCATAGTCTGCCC		
mer5-qf	CTGTGGCCAGTCATGGATGT	60°C	<i>mcr-5</i>
mer5-qr	CGAATGCCCGAGATGACGTA		
ermAF	CCTTCTCAACGATAAGATAGC	56°C	<i>ermA</i>
ermAR	ATGGAGGCTTATGTCAAGTG		
ermB1	CCGAACACTAGGGTTGCTC	56°C	<i>ermB</i>
ermB2	ATCTGGAACATCTGTGGTATG		
blaTEM1F	CATTTTCGTGTCGCCCTTAT	56°C	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>
blaTEM1R	GGCGGAAAACCTCTCAAGGAT		
blaSHVF	CGTTCCTCATGATGACACCTTT	60°C	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
blaSHVR	TCCTGTGGCGATAGTGGATCTTT		
RTCTX-M-F	CTATGGCACCACCAACGATA	58°C	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>
RTCTX-M-R	ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT		
FW3_CMY-2_Lahey	AGACGTTTAACGGCGTGTTG	58°C	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
RV4_CMY-2_Lahey	TAAGTGCAGCAGGCGGATAC		
blaOXA1F	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	56°C	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>
blaOXA1R	CGCATCAAATGCCATAAGTG		
OXA-rtF	AGGCACGTATGAGCAAGATG	56°C	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>
OXA-rtR	TGGCTTGTTTGACAATACGC		
VIM-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	58	<i>bla<sub>VIM-2</sub></i>
VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG		
Ndm-rtF	GATTGCGACTTATGCCAATG	56°C	<i>bla<sub>NDM</sub></i>
Ndm-rtR	TCGATCCCAACGGTGATATT		
qnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	56°C	<i>qnrA</i>
qnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
qnrBF	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	56°C	<i>qnrB</i>
qnrBF	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
qnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	60°C	<i>qnrS</i>
qnrSm-F	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
oqxAF	CTCGGCGCGATGATGCT	60°C	<i>oqxA</i>
oqxAR	CCACTCTTCACGGGAGACGA		
oqxBKF	TCCTGATCTCCATTAACGCCCA	60°C	<i>oqxB</i>
oqxBKR	ACCGGAACCCATCTCGATGC		
16S-qF	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	60°C	<i>16S</i>
16S-qR	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		



**Figura 3.**  $\beta$ -diversity dei campioni di pollina e suolo.



**Figura 4.** Abbondanza relativa di ARG rispetto al numero di copie di 16S rRNA in campioni di pollina e suolo.  $p < 0.05$  mostrato come \*,  $p < 0.01$  come \*\*,  $p < 0.001$  come \*\*\* e  $p < 0.0001$  come \*\*\*\*. Le differenze non significative sono indicate dai ns.



## BIBLIOGRAFIA

1. Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
2. Berendsen, B. J. A., Lahr, J., Nibbeling, C., Jansen, L. J. M., Bongers, I. E. A., Wipfler, E. L., & van de Schans, M. G. M. (2018). The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere*, *204*, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.042>
3. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
4. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
5. Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(14), 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>
6. Chiesa, L. M., Nobile, M., Malandra, R., Panseri, S., & Arioli, F. (2018). Occurrence of antibiotics in mussels and clams from various FAO areas. *Food Chemistry*, *240*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.072>
7. Daly, M. L., & Silverstein, D. C. (2009). Chapter 197 - Fluoroquinolones. In *Small Animal Critical Care Medicine* (pp. 835–839). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2591-7.10197-3>
8. Das, S., Jeong, S. T., Das, S., & Kim, P. J. (2017). Composted cattle manure increases microbial activity and soil fertility more than composted swine manure in a submerged rice paddy. *Frontiers in Microbiology*, *8*(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01702>
9. Dong, W. Y., Zhang, X. Y., Dai, X. Q., Fu, X. L., Yang, F. T., Liu, X. Y., Sun, X. M., Wen, X. F., & Schaeffer, S. (2014). Changes in soil microbial community composition in response to fertilization of paddy soils in subtropical China. *Applied Soil Ecology*, *84*, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.06.007>
10. European commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union*.
11. European Union. (2008). *European Commission, Health and Consumer Protection, Directorate General, Directorate E, Safety of the Food Chain, Document SANCO/2004/2726-revision 4, December 2008, Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC* (Issue December).

12. Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(10), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
13. Graham, D. W., Knapp, C. W., Christensen, B. T., McCluskey, S., & Dolfing, J. (2016). Appearance of  $\beta$ -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20th Century. *Scientific Reports*, *6*(February), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep21550>
14. Hamm, A. C., Tenuta, M., Krause, D. O., Ominski, K. H., Tkachuk, V. L., & Flaten, D. N. (2016). Bacterial communities of an agricultural soil amended with solid pig and dairy manures, and urea fertilizer. *Applied Soil Ecology*, *103*, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.015>
15. Hou, J., Wan, W., Mao, D., Wang, C., Mu, Q., Qin, S., & Luo, Y. (2015). Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(6), 4545–4554. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3632-y>
16. Hruby, C. E., Soupir, M. L., Moorman, T. B., Shelley, M., & Kanwar, R. S. (2016). Effects of tillage and poultry manure application rates on Salmonella and fecal indicator bacteria concentrations in tiles draining Des Moines Lobe soils. *Journal of Environmental Management*, *171*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.01.040>
17. Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*, *2*(5), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006–2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>
18. Kim, B. H., Wang, M., Chi, H. P., Kim, E. C., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2009). *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(8), 3582–3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08>
19. Kumari, P., Choi, H. L., & Sudiarto, S. I. A. (2015). Assessment of bacterial community assembly patterns and processes in pig manure slurry. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139437>
20. Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., & Stanton, T. B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(5), 1691–1696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109>
21. Lopatto, E., Choi, J., Colina, A., Ma, L., Howe, A., & Hinsla-Leasure, S. (2019). Characterizing the soil microbiome and quantifying antibiotic resistance gene dynamics in agricultural soil following swine CAFO manure application. *Plos One*, *14*(8), e0220770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220770>
22. Marti, R., Tien, Y. C., Murray, R., Scott, A., Sabourin, L., & Topp, E. (2014). Safely coupling livestock and crop production systems: How rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(10), 3258–3265. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-14>
23. Milan, M., Carraro, L., Fariselli, P., Martino, M. E., Cavalieri, D., Vitali, F., Boffo, L., Patarnello, T., Bargelloni, L., & Cardazzo, B. (2018). Microbiota and

- environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams. *Aquatic Toxicology*, 194(July 2017), 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.019>
24. Munk, P., Knudsen, B. E., Lukjacenko, O., Duarte, A. S. R., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Smit, L. A. M., Schmitt, H., Garcia, A. D., Hansen, R. B., Petersen, T. N., Bossers, A., Ruppé, E., Graveland, H., van Essen, A., Gonzalez-Zorn, B., Moyano, G., Sanders, P., Chauvin, C., ... Aarestrup, F. M. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microbiology*, 3(8), 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9>
  25. Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
  26. Pruden, A., Arabi, M., & Storteboom, H. N. (2012). Correlation Between Upstream Human Activities and Riverine Antibiotic Resistance Genes. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 11541–11549. <https://doi.org/10.1021/es302657r>
  27. Qiao, M., Ying, G. G., Singer, A. C., & Zhu, Y. G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, 110(July 2017), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.016>
  28. Riber, L., Poulsen, P. H. B., Al-Soud, W. A., Skov Hansen, L. B., Bergmark, L., Brejnrod, A., Norman, A., Hansen, L. H., Magid, J., & Sørensen, S. J. (2014). Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12403>
  29. Rieke, E. L., Soupir, M. L., Moorman, T. B., Yang, F., & Howe, A. C. (2018). Temporal Dynamics of Bacterial Communities in Soil and Leachate Water After Swine Manure Application. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03197>
  30. Rovira, P., McAllister, T., Lakin, S. M., Cook, S. R., Doster, E., Noyes, N. R., Weinroth, M. D., Yang, X., Parker, J. K., Boucher, C., Booker, C. W., Woerner, D. R., Belk, K. E., & Morley, P. S. (2019). Characterization of the Microbial Resistome in Conventional and “Raised Without Antibiotics” Beef and Dairy Production Systems. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01980>
  31. Stocker, M. D., Pachepsky, Y. A., Hill, R. L., & Shelton, D. R. (2015). Depth-dependent survival of *Escherichia coli* and enterococci in soil after manure application and simulated rainfall. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4801–4808. <https://doi.org/10.1128/AEM.00705-15>
  32. Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
  33. Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., & Wang, R. (2011). Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere*, 82(10), 1408–1414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.044>

chemosphere.2010.11.067

34. Xia, X., Wang, Z., Fu, Y., Du, X. dang, Gao, B., Zhou, Y., He, J., Wang, Y., Shen, J., Jiang, H., & Wu, Y. (2019). Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of *mcr-1* gene in swine feedlots. *Environment International*, 127(March), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.061>
35. Xie, W. Y., Yuan, S. T., Xu, M. G., Yang, X. P., Shen, Q. R., Zhang, W. W., Su, J. Q., & Zhao, F. J. (2018). Long-term effects of manure and chemical fertilizers on soil antibiotic resistance. *Soil Biology and Biochemistry*, 122(November 2017), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.009>
36. Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., Zhong, X., Liang, W., & Zeng, Z. (2015). Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro)quinolones-containing manure in arable soil. *Chemosphere*, 119, 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.040>
37. Zakrzewski, M., Proietti, C., Ellis, J. J., Hasan, S., Brion, M. J., Berger, B., & Krause, L. (2017). Calypso: A user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions. *Bioinformatics*, 33(5), 782–783. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw725>
38. Zhang, S., Sun, L., Wang, Y., Fan, K., Xu, Q., Li, Y., Ma, Q., & Wang, J. (2020). *Cow manure application effectively regulates the soil bacterial community in tea plantation*. 1–11.
39. Zhao, X., Wang, J., Zhu, L., Ge, W., & Wang, J. (2017). Environmental analysis of typical antibiotic-resistant bacteria and ARGs in farmland soil chronically fertilized with chicken manure. *Science of the Total Environment*, 593–594, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.062>



## EVIDENZE SIEROLOGICHE DI CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO C IN GERMANI REALI IN NORD ITALIA

Legnardi M.<sup>1</sup>, Allée C.<sup>2</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>, Brown P.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020, Legnaro (PD), Italy

<sup>2</sup> VIPAC Unit, Anses (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, B.P.53, 22440 Ploufragan, France

### Summary

Avian metapneumovirus (aMPV) is a single-stranded negative-sense RNA virus which causes respiratory and reproductive signs in different avian species, bearing a significant economic impact especially on turkey farming. To date, four subtypes (A, B, C and D) have been described, which differ generically, antigenically and in terms of host range. Subtype C viruses are further divided into two lineages, a North American turkey-adapted lineage and a Eurasian lineage affecting ducks.

To assess the presence of the different subtypes in Northern Italy, a serological survey was performed in summer 2019 on 10 Pekin duck flocks and one mallard flock. For each flock, 20 blood samples were taken at slaughter. Sera were then analyzed with a panel of ELISAs to detect antibodies specific to subtype A, B and C.

All Pekin ducks were negative for every subtype, however all mallard sera tested positive for aMPV-C. Anamnestic data about the positive flock were recovered retrospectively. The animals were reared indoors and slaughtered at 130 days. They had not been vaccinated for aMPV and no clinical signs were reported during the production cycle.

This pilot study presents the first serological evidence of aMPV-C presence in ducks in Italy, where the only currently circulating subtype according to recent studies is aMPV-B. Besides intensive raised ducks, this work also has implications on the possible role of wild waterfowl in aMPV spreading and circulation. Further research efforts will be targeted towards the screening of a larger panel of samples, possibly including other susceptible species, to obtain virus isolates and the genome sequences of these viruses.

### INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviare (aMPV) è un virus a singolo filamento di RNA a polarità positiva e dotato di *envelope*, unico esponente dell'omonimo genere della famiglia *Pneumoviridae* oltre al Metapneumovirus umano (hMPV) (1). Descritto per la prima volta nel 1979 in Sud Africa (2), è oggi ampiamente diffuso a livello globale.

aMPV è l'agente eziologico di una sindrome respiratoria dalla presentazione caratteristica ma non patognomonica a cui ci si riferisce con diversi nomi, tra cui rinotracheite aviare (ART), rinotracheite del tacchino (TRT), e, nel pollo, sindrome della testa gonfia (SHS). Il virus è inoltre associato a problematiche riproduttive con ripercussioni negative sulla produzione e qualità delle uova. L'impatto economico e sanitario del virus è di particolare rilevanza per l'allevamento del tacchino, ma una crescente attenzione e preoccupazione nei confronti di aMPV si osserva anche nel settore del pollo da carne (3). Tra le specie, domestiche o selvatiche, suscettibili o

risultate positive con metodiche molecolari ad aMPV si annoverano anche anatre, oche ed altri anatidi, gabbiani, faraone e passeri (4, 5, 6); una sieroconversione a seguito dell'esposizione al virus è stata inoltre osservata in piccioni, struzzi, fagiani, corvidi e varie altre specie (7, 8, 9).

Sono ad oggi noti quattro distinti sottotipi di aMPV (A, B, C e D), i quali differiscono a livello genetico, antigenico e in termini di localizzazione geografica e di spettro d'ospite: aMPV-A e -B sono i due sottotipi di maggior rilevanza, e appartengono ad un cluster separato rispetto ad aMPV-C, il quale è geneticamente più vicino a hMPV, con cui si ipotizza condivida l'origine (10). All'interno del sottotipo C sono inoltre individuabili due *lineage*, uno ritrovabile in Nord America ed uno in Europa e Asia (11). Il sottotipo D è infine stato identificato una sola volta, retrospettivamente, in campioni francesi degli anni '80 (12).

Tra i diversi sottotipi esistono marcate differenze in termini di spettro d'ospite: in un recente studio che prevedeva una serie di infezioni sperimentali con i diversi sottotipi, i tacchini sono risultati sensibili ai sottotipi A, B, D ed al *lineage* Nordamericano di aMPV-C; nelle anatre l'unica suscettibilità osservata è stata quella nei confronti del *lineage* Eurasiatico del sottotipo C; nel pollo, i sottotipi A e B sono stati in grado di indurre sintomatologia, mentre il sottotipo D ha determinato una sieroconversione ed è stato possibile isolare aMPV-C, seppur in assenza di sieroconversione o di positività a livello molecolare (13). In uno studio precedente, un ceppo classificato come aMPV-C è stato isolato in Cina in broiler con sintomatologia respiratoria (14), ma non è possibile determinare a quale dei due *lineage* appartenesse.

Il quadro epidemiologico di aMPV presenta alcuni punti che restano ancora oscuri, in primis in merito al grado di suscettibilità di varie specie minori e al possibile coinvolgimento di animali selvatici migratori nella diffusione del virus.

Per ottenere informazioni riguardo la potenziale circolazione dei vari sottotipi in Italia, uno studio pilota è stato condotto con metodiche sierologiche specifiche su anatre allevate intensivamente nel Nord Italia.

## **MATERIALI E METODI**

I campioni di sangue destinati all'analisi sono stati prelevati in un macello di anatre durante l'estate del 2019. Per ogni gruppo di animali sono stati prelevati 20 campioni, a cui sono state associate informazioni riguardo la specie, la località dell'allevamento d'origine, il sesso e l'età alla macellazione.

I sieri così ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al momento delle analisi, che sono state precedute da un trattamento al caolino per evitare di incorrere in reazioni aspecifiche.

I campioni sono stati quindi sottoposti ad un pannello di saggi ELISA indiretti *in-house*, ciascuno specifico per un determinato sottotipo, presso i laboratori ANSES di Ploufragan-Plouzané-Niort, seguendo le metodiche descritte da Giraud et al. (15). Come controlli sono stati utilizzati sieri di anatra, uno negativo e altri tre rispettivamente positivi ad anticorpi specifici per i sottotipi A, B e C.

## **RISULTATI**

Sono stati analizzati un totale di 220 sieri, prelevati da dieci gruppi di anatre Pechino (*Anas platyrhynchos domesticus*) e da uno di germani reali (*Anas platyrhynchos*), tutti provenienti da allevamenti situati in Veneto e Lombardia.

Sette dei gruppi di anatre Pechino erano composti interamente da femmine ed erano stati macellati ad un'età compresa tra i 58 e 66 giorni, mentre i tre gruppi di animali maschi erano stati macellati tra gli 87 e gli 89 giorni. I germani reali, il cui gruppo era composto da animali di entrambi i sessi, era stato macellato a 130 giorni.

La totalità delle anatre è risultata negativa a ciascuno dei tre sottotipi testati, mentre tutti i germani reali sono risultati positivi al sottotipo C. Sei germani sono risultati inoltre positivi borderline per aMPV-B, ed uno anche per aMPV-A.

I dati anamnestici riguardanti il gruppo di germani reali sono stati ottenuti retrospettivamente. Gli animali erano stati allevati al chiuso per l'intero ciclo produttivo, durante il quale non è stata osservata alcuna sintomatologia.

## DISCUSSIONE

Quelle riportate sono le prime evidenze sierologiche della presenza di aMPV-C in Italia, paese dove l'unico sottotipo di cui è riportata la circolazione è attualmente aMPV-B (16, 17). Va però puntualizzato come quasi tutti gli studi epidemiologici su aMPV si focalizzano su tacchini e polli e sui due sottotipi (A e B) più frequentemente riscontrati in Europa, mentre la situazione in merito ad anatre ed altre specie minori è pressoché sconosciuta.

Ad oggi, aMPV-C è stato ritrovato solo in Nord America, Asia ed Europa, dove è segnalato quasi esclusivamente in Francia (3). Basandosi sulla localizzazione geografica e sulla specie in cui sono stati rinvenuti, il rinvenimento di anticorpi contro aMPV-C qui riportato è plausibilmente da addursi ad un'infezione con un ceppo appartenente al *lineage* Eurasiatico adattato agli anatidi. Per confermare questa ipotesi, è però necessaria una caratterizzazione di tipo molecolare.

Tra gli animali investigati, solo i germani reali sono risultati sierologicamente positivi ad aMPV, pur in assenza di sintomatologia di alcun tipo. La suscettibilità dei germani reali ad aMPV-C era già stata riscontrata in uno studio di van Boheemen et al. (18), in cui questo sottotipo era stato ritrovato in un esemplare selvatico in Olanda. Nonostante gli animali positivi provenissero da un allevamento intensivo, i risultati di questo studio sembrano corroborare l'ipotesi che gli uccelli acquatici, specie se migratori, possano avere un ruolo nella diffusione e nella circolazione di aMPV (9, 19). Ciò avrebbe implicazioni di notevole importanza, se si considera come i germani reali siano tra gli uccelli selvatici più diffusi in natura, specialmente in un'area densamente popolata di allevamenti avicoli come la Pianura Padana (20).

Riguardo alle positività riscontrate in alcuni germani reali nei confronti di aMPV-B, e in un caso anche di aMPV-A, esse sono state considerate come reazioni aspecifiche. Il rinvenimento di anticorpi contro il sottotipo C tramite l'uso di metodiche ELISA specifiche per i sottotipi A e B è già stato descritto, ed è anzi il motivo per cui aMPV-C è stato scoperto (21).

## CONCLUSIONI

I risultati presentati hanno permesso di evidenziare la possibile circolazione di aMPV-C in anatre allevate intensivamente in Nord Italia. Ciononostante, questo lavoro va inteso come uno studio pilota, le cui conclusioni vanno corroborate ed espanse attraverso ulteriori ricerche su più larga scala e focalizzate all'identificazione e caratterizzazione molecolare di ceppi appartenenti al sottotipo C. Considerando le tipicità dell'avicoltura italiana, in cui non è raro che specie diverse vengano allevate

in stretta prossimità, l'estensione dello studio ad altre specie suscettibili potrebbe risultare di grande interesse.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la dottoressa Piraska Sabbion per il supporto organizzativo ed esecutivo offerto durante la fase di campionamento e la dottoressa Stefania Laverta per aver fornito i dati anamnestici relativi al gruppo di germani reali indagato.

## BIBLIOGRAFIA

1. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Dempsey DM, Dutilh BE, Harrach B, Harrison RL, Hendrickson RC, Junglen S, et al. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch. Virol.* 164:2417–2429.
2. Buys SB and JH du Preez. (1980). A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys* 36:46.
3. Rautenschlein S. Avian metapneumovirus. (2020). In: David E. Swayne, editor-in-chief. *Diseases of Poultry 14<sup>th</sup> Edition*. Hoboken (NJ): Wiley Blackwell. pp. 135-143.
4. Bennett RS, McComb B, Shin HJ, Njenga MK, Nagaraja KV and DA Halvorson. (2002). Detection of Avian Pneumovirus in Wild Canada Geese (*Branta canadensis*) and Blue-Winged Teal (*Anas discors*). *Avian Dis.* 46:1025-1029.
5. Bennett RS, Nezworski J, Velayudhan BT, Nagaraja KV, Zeman DH, Dyer N, Graham T, Lauer DC, Njenga MK and DA Halvorson. (2004). Evidence of Avian Pneumovirus Spread Beyond Minnesota Among Wild and Domestic Birds in Central North America. *Avian Dis.* 48:902-908. <https://doi.org/10.1637/7208-051804R>
6. Cecchinato M, Lupini C, Silveira F, Listorti V, Mescolini G, Morandini E, Franzo G and E Catelli. (2018). Molecular characterization of avian metapneumovirus from Guinea fowls (*numida meleagris*). *Pak. Vet. J.* 38:419–423. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2018.088>
7. Cadman H, Kelly P, Zhou R, Davelaar F and P Mason. (1994). A Serosurvey Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antibodies against Poultry Pathogens in Ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian Dis.*, 38:621-625. [doi:10.2307/1592088](https://doi.org/10.2307/1592088)
8. Catelli E, Terregino C, De Marco MA, Delogu M and V Guberti. (2001). Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Vet. Rec.* 149:56-58.
9. Turpin EA, Stallknecht DE, Slemons RD, Zsak L and DE Swayne. (2008). Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathol.* 37:343-351. [doi:10.1080/03079450802068566](https://doi.org/10.1080/03079450802068566)
10. Luo L, Sabara MI and Y Li. (2009). Analysis of antigenic cross-reactivity between subgroup C avian pneumovirus and human metapneumovirus by using recombinant fusion proteins. *Transbound. Emerg. Dis.* 56:303-310. [doi:10.1111/j.1865-1682.2009.01085.x](https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01085.x)

11. Toquin D, Guionie O, Jestin V, Zwengelstein F, Allee C and N Eterradossi. (2006). European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*. 32:97–103. doi: 10.1007/s11262-005-5850-3.
12. Bayon-Auboyer MH, Arnauld C, Toquin D and N Eterradossi. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses. *J. Gen. Virol.* 2000 81:2723-2733. doi:10.1099/0022-1317-81-11-2723
13. Brown PA, Allée C, Courtillon C, Szerman N, Lemaitre E, Toquin D, Mangart JM, Amelot M and N Eterradossi. (2019). Host specificity of avian metapneumoviruses. *Avian Pathol.* 48(4):311-318. doi:10.1080/03079457.2019.1584390
14. Wei L, Zhu S, Yan X, Wang J, Zhang C, Liu S, She R, Hu F, Quan R and J Liu. (2013). Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1092-1094. doi: 10.3201/eid1907.121126
15. Giraud P, Toquin D, Picault JP, Guittet M and G Bennejean. (1987). Utilisation de la méthode ELISA pour le sérodiagnostic de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse chez la dinde, la poule et la pintade. *Bull. Lab. Vét.* 27-28:65-70.
16. Mescolini G, Lupini C, Franzo G, Quaglia G, Legnardi M, Cecchinato M, Tucciarone CM, Blanco A, Turblin V, Blarnés M, Tatone F, Falchieri M and E Cattelli. (2020). What is new on molecular characteristics of Avian metapneumovirus strains circulating in Europe? *Transbound. Emerg. Dis.* 00: 1– 9. <https://doi.org/10.1111/tbed.13788>
17. Tucciarone CM, Franzo G, Lupini C, Torres Alejo C, Listorti V, Mescolini G, Brandao PE, Martini M, Cattelli E and M Cecchinato. (2018). Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97:503–509.
18. van Boheemen S, Bestebroer TM, Verhagen JH, Osterhaus ADME, Pas SD and RAM Fouchier. (2012). A Family Wide RT-PCR Assay for Detection of Paramyxoviruses and Application to a Large-Scale Surveillance Study. *PLOS ONE* 7: e34961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034961>
19. Cha RM, Yu Q and L Zsak. (2013). The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. *Virol. J.* 10:38. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-38>
20. Baratti M, Baccetti N, Cordaro M, Mori A and F Dessi-Fulgheri. (2015). Investigating the puzzling genetic structure of mallard populations (*Anas platyrhynchos* L.) in Italy. *Eur. J. Wildl. Res.* 61: 81–89. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0876-2>
21. Cook JKA and D Cavanagh. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathol.* 31:117-132. doi:10.1080/03079450120118603



# SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA DI CEPPI *ESCHERICHIA COLI* E DIFFUSIONE DI *E. COLI* ESBL IN POLLI DA CARNE BIOLOGICI, ANTI-BIOTIC FREE E CONVENZIONALI ALLA MACELLAZIONE

Musa L.<sup>1</sup>, Franciosini M.P.<sup>1, 2</sup>, Branciarì R.<sup>1</sup>, Menchetti M.<sup>1</sup>, Marenzoni M.L.<sup>1</sup>, Ranucci D.<sup>1</sup>, Shtylla Kika T.<sup>2</sup>, Casagrande-Proietti P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, 06126 Perugia, Italia.

<sup>2</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Agraria di Tirana, Albania.

## Summary

Our work investigated *Escherichia coli* susceptibility to different antimicrobials and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) *E. coli* diffusion from samples collected in slaughterhouse from conventional (C), organic (O) and reared without antibiotics (AF) chickens. The highest number of *E. coli* strains resistant to ampicillin (89.6%), trimethoprim/sulfamethoxazole (62.2%), nalidixic acid (57.8%), ciprofloxacin (44.4%), and cefotaxime (43.7%) with prevalent patterns of multi-resistance to three (35.1%) and to four antimicrobials (31.3%) was seen in C samples as well as the highest numbers of ESBL *E. coli* while the lowest in O samples. Our results are consistent with an influence of farming typology regarding the susceptibility of *E. coli* and the presence of ESBL *E. coli*, that was highest in the samples coming from C farms, where the use of antibiotics is common. O samples exhibited the lowest value for ESBL due to a lack of antimicrobial treatment in chickens and to the possibility to have access to the outdoors, limiting also contact with litter as a potential source of resistant bacteria.

## INTRODUZIONE

L'uso indiscriminato di antibiotici nel pollame ha contribuito al progressivo aumento della resistenza batterica alle principali classi di antibiotici quali chinoloni, tetracicline e beta-lattamici (Van Den Bogaard et al., 2000; Hricovà et al., 2017). Inoltre, la continua esposizione dei batteri a una grande varietà di  $\beta$ -lattamici ha causato la mutazione delle  $\beta$ -lattamasi batteriche, responsabile dello sviluppo di resistenze anche nei confronti di  $\beta$ -lattamici di nuova generazione. Questi enzimi sono noti come  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL). *Escherichia coli* è una delle specie batteriche in cui la selezione dei geni di resistenza è avvenuta più rapidamente negli anni a seguito dell'uso diffuso e improprio di antimicrobici (Tadesse et al., 2012). I geni responsabili della resistenza sono spesso localizzati in elementi genetici trasferibili come plasmidi e integroni (Ahmed et al., 2013; Cavicchio et al., 2015) e gli *E. coli* patogeni e commensali possono facilmente ricevere geni di resistenza antimicrobica e trasmetterli ad altri batteri del microbiota intestinale anche per coniugazione (Carattoli et al., 2008; Laxminarayan et al., 2013). In questo scenario, polli e tacchini commerciali sono considerati un importante serbatoio di isolati multiresistenti di *E. coli* ed *E. coli* ESBL per l'uomo (Falgenhauer et al., 2019). Per garantire al consumatore una maggiore sicurezza alimentare, numerose aziende avicole si sono rivolte a linee di prodotti ottenute da allevamenti antibio-

tic-free e biologici ottenuti senza o limitando l'uso di antibiotici. In alternativa all'impiego degli antimicrobici attualmente il controllo delle malattie in campo avicolo, soprattutto per *E. coli*, si basa in prevalenza sulla qualità dell'ambiente e del management e sull'utilizzo di prodotti alternativi quali prebiotici, probiotici e vaccini autogeni (Fanatico et al., 2009; Diaz-Sanchez et al., 2015; Koutsianos et al., 2020). L'azione esercitata dal sistema di allevamento, nel controllo dei batteri resistenti agli antibiotici nelle carcasse di pollo (Cui et al., 2005; Miranda et al., 2008), presenta spesso aspetti contraddittori. Da studi condotti da Kim et al. (2018) è emerso che nel caso di *Enterococcus* spp. i tassi di contaminazione batterica erano inferiori nelle carcasse di pollo biologico rispetto alle carcasse di pollo ottenuto da allevamenti convenzionali, così come il livello di resistenza a determinati antibiotici e la presenza di ceppi multiresistenti. Al contrario, Parker et al. (2016) hanno dimostrato la presenza di Salmonelle ESBL in prodotti a base di carne di pollo ottenuti da allevamenti antibiotic-free ed inoltre la mancanza di differenze tra i loro geni ESBL e quelli di Salmonelle isolate da prodotti a base di carne di pollo allevato tradizionalmente. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di contribuire a definire il ruolo giocato da diverse tipologie di allevamento (convenzionale, biologico e antibiotic-free) nell'influenzare la suscettibilità antimicrobica dei ceppi di *E. coli* e la diffusione di *E. coli* ESBL, in campioni prelevati al macello da soggetti all'arrivo e alla macellazione.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Un totale di 406 ceppi di *E. coli* sono stati isolati da tamponi cloacali e da campioni di pelle al macello. In particolare, 135 *E. coli* sono stati raccolti da polli convenzionali (C) (68 ceppi da tamponi cloacali e 67 da campioni di pelle), 131 da polli allevati senza antibiotici (AF) (64 ceppi da tamponi cloacali e 67 da campioni di pelle), 140 da polli biologici (O) (70 ceppi da tamponi cloacali e 70 da campioni di pelle). I tamponi cloacali (7 per ogni allevamento) sono stati eseguiti individualmente all'arrivo al macello e campioni di pelle (7 per ogni allevamento) sono stati anche raccolti individualmente dalle carcasse alla uscita del tunnel di refrigerazione. Sono stati considerati dieci allevamenti per ogni tipologia di allevamento esaminata.

### *Isolamento e identificazione di E. coli e di E.coli ESBL*

Sia i tamponi cloacali che i campioni di pelle sono stati posti in un terreno di pre-arricchimento costituito da acqua peptonata (BPW) in un rapporto di 1:10 e sono stati quindi incubati a 37° C per 18-24 ore in aerobiosi; 0.1 ml di ciascun campione diluito è stato seminato su agar MacConkey e su agar MacConkey, aggiunto a una bassa concentrazione (1 mg /L) di cefotaxime (Thermo Fisher Scientific, MI, Italia). Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37 ° C in condizioni aerobiche. Tutte le colonie con morfologia tipica di *E. coli* sono state selezionate e confermate da test biochimici (ISO). Per tutti gli *E. coli*, la produzione di ESBL è stata confermata dal test del disco combinato con cefotaxime e ceftazidime da sole e in combinazione con acido clavulanico e dal metodo di microdiluzione utilizzando piastre beta-lattamasi a spettro esteso Sensititre™ (Thermo Fisher Scientific, MI, Italia). I risultati sono stati valutati secondo le linee guida del Clinical and

Laboratory Standards Institute (CLSI).

### *Test di sensibilità agli antibiotici*

Per valutare la suscettibilità antimicrobica, tutti gli isolati di *E. coli* sono stati analizzati su piastre di agar Mueller-Hinton (Thermo Fisher Scientific, MI, Italia), contenenti ampicillina (AMP) (10 µg), cefotaxime (CTX) (30 µg), ceftazidime (CAZ) (30 µg), amoxicillina / acido clavulanico (AMC) (30 µg), acido nalidixico (NA) (30 µg), ciprofloxacina (CIP) (5 µg), trimetoprim / sulfametossazolo (SXT) (25 µg), (TET) tetraciclina (30 µg), gentamicina (CN) (10 µg). Le piastre sono state incubate a 37 ° C per 24 ore in condizioni di aerobiosi .

### *Analisi statistica*

Sono stati utilizzati modelli lineari generalizzati (GLM) per valutare l'effetto dell'allevamento (tre livelli: allevamenti convenzionali, antibiotic-free e biologici) e il tipo di campione (due livelli: prelievi cutanei e tamponi cloacali). Il logit multinomiale e cumulativo erano rappresentati dalla distribuzione di probabilità e la funzione di collegamento, rispettivamente, e utilizzate per valutare ciascuna resistenza agli antibiotici classificata come sensibile, intermedia e resistente. Per analizzare *E. coli* ESBL, distribuzione binomiale e logit sono stati utilizzati rispettivamente come modello di distribuzione di probabilità e funzione di collegamento. Inoltre, sono stati utilizzati z-test con correzione Bonferroni per confrontare le proporzioni delle colonne. Per valutare i fattori che influenzano il numero di ceppi di resistenza, sono stati utilizzati la distribuzione di Poisson e la funzione Log link. I pattern di multiresistenza che includevano  $\geq 10$  eventi per variabile (EPV) (Peduzzi et al., 1995) sono stati codificati come 0 (negativo) e 1 (positivo) e analizzati mediante modelli lineari generalizzati GLM. Questi modelli hanno utilizzato la distribuzione binomiale e logit come distribuzione di probabilità e funzione di collegamento, rispettivamente, e hanno valutato l'effetto dell'allevamento e del tipo di campione. Le distribuzioni all'interno delle variabili categoriche sono state valutate utilizzando il test chi quadrato come test di bontà per l'adattamento, assumendo che tutte le categorie siano uguali. Un valore  $P < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software di analisi statistica SPSS versione 25.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

## **RISULTATI**

Indipendentemente dal sistema di allevamento e dal tipo di campione, il numero più alto di *E. coli* resistente è stato osservato per l'ampicillina (76,6%), seguito da tetraciclina (68,4%), acido nalidixico (43,6%), trimetoprim / sulfametossazolo (40,1%) e amoxicillina / acido clavulanico (35,7%). In totale, il 30,5% e il 29,6% dei ceppi sono risultati resistenti rispettivamente a cefotaxime e ciprofloxacina e l'11,8% e il 10,8% dei ceppi erano resistenti rispettivamente alla gentamicina e alla ceftazidima. Confrontando la suscettibilità degli isolati in base al sistema di allevamento (Tabella 1), i livelli più alti di resistenza per ampicillina (89,6%  $P = 0,002$ ), cefotaxime (43,7%;  $P = 0,001$ ), acido nalidixico (57,8%;  $P = 0,001$ ), ciprofloxacina (44,4%;  $P < 0,001$ ) e trimetoprim / sulfametossazolo (62,2%;  $P > 0,001$ ) sono stati osservati in *E. coli* isolato da campioni di pollo allevato in maniera convenzionale. È stata riscontrata una elevata prevalenza di ceppi di *E. coli*

resistenti in campioni AF, O e C per la tetraciclina (rispettivamente 71%, 65,7% e 68,9%). Rispetto al tipo di campioni, sono state riscontrate differenze nella resistenza antimicrobica per amoxicillina / acido clavulanico e ciprofloxacina ( $P < 0,01$ ) (Tabella 1). La maggior parte degli *E. coli* isolati dai polli convenzionali ha mostrato un pattern di multi-resistenza a tre antimicrobici (35,1%), con prevalenza del profilo beta-lattamici/trimetoprim-sulfametossazolo/tetraciclina ( $P < 0,001$ ) e a quattro antimicrobici (31,3%) con prevalenza di un profilo beta-lattamici/chinoloni / trimetoprim-sulfametossazolo/tetraciclina ( $P < 0,001$ ) (Tabella 2). I ceppi di *E. coli* isolati da campioni O e AF hanno rivelato un pattern di co-resistenza del 29,2% e del 39,0%, rispettivamente con prevalenza del profilo beta-lattamici/tetraciclina ( $P < 0,001$ ). Il numero di *E. coli* resistente ai beta-lattamici/tetraciclina isolati da campioni C era inferiore a quello riscontrato per campioni O e AF ( $P < 0,05$ ), mentre gli isolati di *E. coli* da polli C hanno mostrato un pattern di multi-resistenza verso beta-lattamici/chinoloni / trimetoprim-sulfametossazolo / tetraciclina significativamente più alto rispetto a quello osservato per allevamenti O e AF ( $P < 0,05$ ; Tabella 3). Settantadue ceppi di *E. coli* ESBL (18,6%) sono stati isolati da tutti i campioni; in particolare per quanto riguarda quelli cloacali 19 (27,9%) sono stati isolati da C, 7 (10,9%) da AF e 9 (12,9%) da O. Gli isolati di *E. coli* ESBL dalla pelle sono stati 1 da O (1,4%), 15 da AF (22,4%) e 21 da C (31,3%) ( $p < 0,001$ ) (Tabella 4).

## DISCUSSIONE

L'emergere della resistenza agli antibiotici negli animali e nell'uomo ha portato a cambiamenti nel settore zootecnico finalizzati ad una sempre più progressiva riduzione dell'uso degli antimicrobici, sia come metafilassi che come strumenti terapeutici. Sono aumentate le aziende con una gestione che prevede l'uso di antibiotici solo se strettamente necessario, come nel caso di allevamenti biologici e antibiotic-free. Nel nostro lavoro, indipendentemente dalla tipologia di campionamento e di allevamento, è stato riscontrato un numero elevato di ceppi resistenti di *E. coli* per ampicillina, tetraciclina e acido nalidixico, seguiti da trimetoprim-sulfametossazolo e amoxicillina-acido clavulanico. Tutte queste molecole, utilizzate da anni nella terapia e prevenzione del pollame, hanno favorito la selezione di batteri resistenti (Wassenaar et al., 2005) condivisibili con la popolazione umana tramite contaminazione alimentare o ambientale, nonché mediante contatto diretto con gli animali (Diarra et al., 2007; Ljubojevic et al., 2016;). Il numero di ceppi di *E. coli* resistenti ad ampicillina, acido nalidixico, cefotaxime, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametossazolo è risultato significativamente più alto nei campioni di pollo allevato convenzionalmente, supportando l'ipotesi che l'uso di antibiotici in questo management possa esercitare una pressione selettiva sulla comunità microbica, facilitando così la persistenza e il trasferimento dei geni di resistenza tra le specie batteriche (Wright et al., 2010; Andersson et al., 2012). Uno studio recente ha mostrato una maggiore prevalenza di resistenza tra gli isolati di *E. coli* dai tacchini da carne convenzionali rispetto ai tacchini antibiotic-free e biologici, ma non sono state osservate differenze nella suscettibilità antimicrobica negli isolati di *E. coli* ottenuti da polli da carne (Davis et al., 2018). Mollenkopf et al. (2014) non hanno isolato batteri resistenti a farmaci antimicrobici di importanza critica, come cefalosporine, polimixine, chinoloni e macrolidi (WHO, 2019) tra i prodotti a base

di pollo biologico e quelli originati dall'allevamento convenzionale. Nel nostro lavoro, un certo numero di ceppi di *E. coli* resistenti alla tetraciclina e all'ampicillina sono stati isolati anche da campioni biologici e antibiotic-free nonostante l'assenza dell'uso di antimicrobici. In tal caso non deve essere trascurata l'azione esercitata dall'ambiente esterno, spesso contaminato da batteri resistenti del suolo o tramite feci di uccelli selvatici (Rizzo et al., 2013; Boy-Roura et al., 2018). E' da segnalare anche la presenza di ceppi resistenti nei pulcini di un giorno, probabilmente infettati per via verticale (Bortolaia et al., 2010; Jiménez-Belenguer et al., 2016). È tuttavia possibile la contaminazione nell'incubatoio stesso o durante il trasporto in azienda ( Projahn et al., 2018); in questo momento, infatti, la colonizzazione precoce di batteri resistenti potrebbe essere favorita anche dalla presenza di una flora intestinale immatura e non sufficientemente competitiva (Persoons et al., 2011). Considerando la tipologia dei campioni, il numero di ceppi di *E. coli* isolati da campioni cloacali sensibili per amoxicillina / acido clavulanico è risultato maggiore rispetto a quello di *E. coli* isolati in campioni di pelle. In questo contesto potrebbe svolgere un ruolo il periodo di digiuno a cui è sottoposto il pollo prima del trasporto al macello, al fine di ridurre il rilascio di feci. Non c'è dubbio che il macello rappresenti un ambiente responsabile della contaminazione crociata da parte di batteri resistenti, soprattutto durante la fase di scottatura, iugulazione ed eviscerazione del pollame (Gregova et al., 2012). La prevalenza di un pattern di resistenza a quattro antibiotici è risultata più alta nei campioni convenzionali rispetto a quelli biologici e antibiotic-free. I profili di multi-resistenza erano spesso rappresentati da tetraciclina, trimetoprim /sulfametossazolo e molecole incluse nella classe dei beta-lattamici e dei chinoloni, a causa del loro uso estensivo negli allevamenti avicoli nel corso degli anni. È noto che la resistenza multipla ai farmaci è frequente a osservarsi nel pollame (Amador et al., 2019) e gli *E. coli* isolati da broiler industriali mostrano resistenza a molteplici agenti antibatterici usati nella terapia umana ( Nhung et al., 2017; EFSA, 2018). Inoltre, il grado di multi-resistenza negli isolati di *E. coli* è più elevato nei polli da carne rispetto ad altri gruppi di animali da allevamento (Hanon et al., 2015). Chuppava et al. (2019) hanno mostrato che lo stretto contatto con la lettiera per la maggior parte del ciclo di produzione del pollo da carne allevato in maniera convenzionale può influenzare la quantità di ceppi multi-resistenti . I nostri risultati concordano con indagini precedenti che riportavano resistenza in *E. coli* isolato da allevamenti di pollame convenzionali a molte classi di antibiotici, inclusi i fluorochinoloni  $\beta$ -lattamici, tetracicline e sulfonamidi (Amador et al., 2019; Chuppava et al., 2019). I polli convenzionali hanno mostrato la percentuale più alta di *E. coli* ESBL, nei campioni cloacali e cutanei, seguiti dai polli antibiotic-free, mentre i polli biologici hanno mostrato la percentuale più bassa specialmente nei campioni di pelle. Il valore più basso si è osservato per i campioni di pollo biologico, supportando l'ipotesi che questi soggetti, a differenza di quanto si verifica nel convenzionale, potendo usufruire di parchetti esterni, limitano il contatto con la lettiera e quindi con le feci. I nostri risultati non sono in accordo con precedenti indagini condotte su prodotti a base di carne di pollo sia biologici che convenzionali, che non hanno riportato differenze considerevoli nel numero di *E. coli* ESBL (Cohen Stuart et al., 2012). Negli ultimi anni, i batteri ESBL provenienti da prodotti alimentari di origine animale hanno rappresentato una minaccia allarmante per la salute pubblica, poiché i

beta-lattamici sono comunemente usati in medicina umana, da soli o associati agli inibitori delle beta-lattamasi. Un recente studio ha riportato che i cloni di *E. coli* resistenti alle cefalosporine, rilevati nell'uomo, sono frequentemente associati a malattie umane e provengono da prodotti alimentari di origine animale (Lazarus et al., 2015), sebbene altri studi abbiano dimostrato che il contributo del pollame è limitato (Borjesson et al 2016; Dorado-Garcia et al., 2018).

## **CONCLUSIONI**

I nostri risultati hanno dimostrato che i sistemi di allevamento giocano un ruolo nel determinismo della resistenza agli antibiotici poiché i campioni provenienti da allevamenti convenzionali hanno presentato il numero più alto sia di ceppi di *E. coli* resistenti alla maggior parte degli antimicrobici testati sia di ceppi con profili di multi-resistenza. Un contatto limitato con la lettiera e la possibilità di usufruire di parchetti esterni durante la loro vita produttiva potrebbe giustificare il numero più basso di *E. coli* ESBL riportato nei campioni biologici. Tuttavia, non va trascurato che un numero di ceppi di *E. coli* resistenti sono stati riscontrati anche da campioni provenienti da soggetti biologici e antibiotic-free. In questo contesto la trasmissione verticale e / o la contaminazione precoce alla schiusa potrebbero rivestire un ruolo determinante insieme alla contaminazione da parte dell'ambiente esterno nel caso dell'allevamento biologico. Sono necessari ulteriori studi per approfondire le nostre conoscenze relativamente al circuito epidemiologico della resistenza agli antibiotici a partire da monitoraggi frequenti e continui della catena di produzione del pollo al fine di ottimizzare le misure di biosicurezza e garantire la sicurezza del prodotto finale.

**Tabella 1.** Effetto della tipologia del campione e dei diversi sistemi di allevamento sulla suscettibilità degli isolati di *E. coli*

		Allevamento						Valore P		
		AF		O		C		Allevamento	Campione	Interazione
		<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%			
AMP	Resistente	89a	67.9%	101a	72.1%	121b	89.6%	<b>0.002</b>	0.154	0.051
	Intermedio	13a	9.9%	12a,b	8.6%	3b	2.2%			
	Sensibile	29a	22.1%	27a	19.3%	11b	8.1%			
CAZ	Resistente	12a,b	9.2%	8b	5.7%	24a	17.8%	<b>0.001</b>	0.791	0.230
	Intermedio	13a	9.9%	2b	1.4%	10a	7.4%			
	Sensibile	106a	80.9%	130b	92.9%	101a	74.8%			
CTX	Resistente	31a	23.7%	34a	24.3%	59b	43.7%	<b>0.001</b>	0.520	<b>0.003</b>
	Intermedio	8a	6.1%	4a	2.9%	5a	3.7%			
	Sensibile	92a	70.2%	102a	72.9%	71b	52.6%			
AMC	Resistente	44a	33.6%	44a	31.4%	57a	42.2%	0.114	<b>0.002</b>	<b>0.016</b>
	Intermedio	26a	19.8%	16a	11.4%	24a	17.8%			
	Sensibile	61a	46.6%	80b	57.1%	54a	40.0%			
NA	Resistente	44a	33.6%	55a	39.3%	78b	57.8%	<b>0.001</b>	0.683	0.087
	Intermedio	12a	9.2%	2b	1.4%	4a,b	3.0%			
	Sensibile	75a	57.3%	83a	59.3%	53b	39.3%			
CIP	Resistente	27a	20.6%	33a	23.6%	60b	44.4%	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.005</b>	<b>0.008</b>
	Intermedio	15a	11.5%	24a	17.1%	28a	20.7%			
	Sensibile	89a	67.9%	83a	59.3%	47b	34.8%			
SXT	Resistente	44a	33.6%	35a	25.0%	84b	62.2%	<b>&lt;0.001</b>	0.952	<b>0.038</b>
	Intermedio	8a	6.1%	4a,b	2.9%	1b	0.7%			
	Sensibile	79a	60.3%	101a	72.1%	50b	37.0%			
TET	Resistente	93a	71.0%	92a	65.7%	93a	68.9%	0.645	0.642	0.326
	Intermedio	5a	3.8%	5a	3.6%	0a	0.0%			
	Sensibile	33a	25.2%	43a	30.7%	42a	31.1%			
CN	Resistente	15a,b	11.5%	10b	7.1%	23a	17.0%	0.185	0.775	0.083
	Intermedio	9a	6.9%	5a,b	3.6%	1b	0.7%			
	Sensibile	107a	81.7%	125a	89.3%	111a	82.2%			

I valori in ogni riga seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo ( $P < 0,05$ ; metodo di Bonferroni). In grassetto i valori di probabilità significativi Ampicillina (AMP), cefotaxime (CTX), ceftazidima (CAZ), amoxicillina / acido clavulanico (AMC), acido nalidixico (NA), ciprofloxacina (CIP), trimetoprim / sulfametossazolo (SXT), tetraciclina (TET) e gentamicina.

AF=Antibiotic-free; O=Biologico;C=Convenzionale

**Tabella 2.** Pattern di resistenza dei ceppi di *E. coli* isolati da soggetti provenienti da allevamenti antibiotic-free (AF) , biologico (O) e convenzionale (C)

Pattern	Allevamento						Pattern di resistenza antimicrobica	Allevamento					
	AF		O		C			AF		O		C	
	<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%		<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%
1	28	23.3%	37	27.2%	10	7.6%							
2	35	29.2%	53	39.0%	23	17.6%	BL/CN	1	0.3%	0	0.0%	0	0.0%
							BL/CHIN	4	1.0%	13	3.4%	3	0.8%
							BL/SXT	0	0.0%	6	1.6%	12	3.1%
							BL/TET	26	6.7%	25	6.5%	7	1.8%
							CHIN/CN	0	0.0%	1	0.3%	1	0.3%
							CHIN/SXT	0	0.0%	1	0.3%	0	0.0%
							CHIN/TET	2	0.5%	7	1.8%	0	0.0%
							SXT/TET	1	0.3%	0	0.0%	0	0.0%
TET/CN	1	0.3%	0	0.0%	0	0.0%							
3	32	26.7%	23	16.9%	46	35.1%	BL/CHIN/CN	0	0.0%	1	0.3%	0	0.0%
							BL/CHIN/SXT	3	0.8%	2	0.5%	11	2.8%
							BL/CHIN/TET	12	3.1%	15	3.9%	20	5.2%
							BL/SXT/TET	14	3.6%	3	0.8%	12	3.1%
							BL/TET/CN	2	0.5%	1	0.3%	2	0.5%
							CHIN/SXT/TET	1	0.3%	1	0.3%	1	0.3%
4	20	16.7%	19	14.0%	41	31.3%	BL/CHIN/SXT/CN	0	0.0%	0	0.0%	2	0.5%
							BL/CHIN/SXT/TET	19	4.9%	17	4.4%	32	8.3%
							BL/CHIN/TET/CN	0	0.0%	2	0.5%	4	01.0%
							BL/SXT/TET/CN	1	0.3%	0	0.0%	3	0.8%
5	5	4.2%	4	2.9%	11	8.4%	BL/CHIN/SXT/TET/CN	5	1.3%	4	1.0%	11	2.8%

BL = beta-lattamici (AMP, AMC, CAZ, CTX); CHIN = chinoloni (CIP, NA), SXT = trimetoprim / sulfametossazolo, TET = tetraciclina, CN = gentamicina

**Tabella 3.** Effetto del campione e della tipologia dell'allevamento sui profili di resistenza.

Pattern di resistenza antimicrobica	Allevamento						Valore P	
	AF		O		C		Allevamento	Campione
	<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%		
<b>BL/CHIN</b>	4a,b	2.9%	13b	9.3%	3a	2.1%	<b>0.012</b>	1.000
<b>BL/TET</b>	26a	18.6%	25a	17.9%	7b	5.0%	<b>0.002</b>	0.587
<b>BL/CHIN/TET</b>	12a	8.6%	15a	10.7%	20a	14.3%	0.287	0.655
<b>BL/SXT/ TET</b>	14a	10.0%	3b	2.1%	12 <sup>a</sup> ,b	8.6%	<b>0.041</b>	0.835
<b>BL/CHIN/SXT/TET</b>	19a	13.6%	17a	12.1%	32b	22.9%	<b>0.041</b>	0.165
<b>BL/CHIN/SXT/TET/CN</b>	5a	3.6%	4a	2.9%	11a	7.9%	0.130	0.349

I valori in ogni riga seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo ( $P < 0,05$ ; metodo di Bonferroni). In grassetto i valori di probabilità significativi  
 BL = beta-lattamici (AMP, AMC, CAZ, CTX); CHIN = chinoloni (CIP, NA), SXT = trimetoprim / sulfametossazolo, TET = tetraciclina, CN = gentamicina.  
 AF=Antibiotic-free; O=Biologico;C=Convenzionale

**Tabella 4.** Isolati di *E. coli* ESBL in campioni cloacali e cutanei provenienti da allevamenti antibiotic-free (AF), biologici (O) e convenzionali (C).

Tipo di campione		Tipo di allevamento						Valore P		
		F		O		C		Allevamento	Campione	Interazione
		<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%	<i>E.coli</i> (No)	%			
Cloacale	Negativo	57a	89.1%	61a	87.1%	49b	72.1%	<b>&lt;0.001</b>	0.281	<b>0.021</b>
	Positivo	7a	10.9%	9a	12.9%	19b	27.9%			
Cutaneo	Negativo	52a	77.6%	69b	98.6%	46a	68.7%			
	Positivo	15a	22.4%	1b	1.4%	21a	31.3%			

valori in ogni riga seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo ( $P < 0,05$ ; metodo di Bonferroni). In grassetto i valori di probabilità significativi

## BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed, A.M.; Shimamoto, T.; Shimamoto, T. Molecular characterization of multi-drug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013, 303, 475–483.
2. Amador, P.; Fernandes, R.; Prudêncio, C.; Duarte, I. Prevalence of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant enterobacteriaceae on portuguese livestock manure. *Antibiotics* 2019, 8.
3. Andersson, D.I.; Hughes, D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist. Updat.* 2012, 15, 162–172.
4. Börjesson, S.; Ny, S.; Egervärn, M.; Bergström, J.; Rosengren, Å.; Englund, S.; Löfmark, S.; Byfors, S. Limited dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and plasmid-encoded AmpC-producing *Escherichia coli* from food and farm animals, sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22, 634–640.
5. Bortolaia, V.; Bisgaard, M.; Bojesen, A.M. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. *Vet. Microbiol.* 2010, 142, 379–386
6. Boy-Roura, M.; Mas-Pla, J.; Petrovic, M.; Gros, M.; Soler, D.; Brusi, D.; Menció, A. Towards the understanding of antibiotic occurrence and transport in groundwater: Findings from the Baix Fluvià alluvial aquifer (NE Catalonia, Spain). *Sci. Total Environ.* 2018, 612, 1387–1406.
7. Carattoli, A. Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, 14, 117–123.
8. Cavicchio, L.; Dotto, G.; Giacomelli, M.; Giovanardi, D.; Grilli, G.; Franciosini, M.P.; Trocino, A.; Piccirillo, A. Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Italy. *Poult. Sci.* 2015, 94, 1202–1208
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th ed.; CLSI supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2019. 26.
10. Chuppava, B.; Keller, B.; Abd El-Wahab, A.; Sürrie, C.; Visscher, C. Resistance reservoirs and multi-drug resistance of commensal *Escherichia coli* from excreta and manure isolated in broiler houses with different flooring designs. *Front. Microbiol.* 2019, 10.
11. Cohen Stuart, J.; van den Munckhof, T.; Voets, G.; Scharringa, J.; Fluit, A.; Hall, M.L. Van Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 154, 212–214
12. Cui, S.; Ge, B.; Zheng, J.; Meng, J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 4108–4111.
13. Davis, G.S.; Waits, K.; Nordstrom, L.; Grande, H.; Weaver, B.; Papp, K.; Horwinski, J.; Koch, B.; Hungate, B.A.; Liu, C.M.; et al. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiol.* 2018, 18.
14. Diarra, M.S.; Silversides, F.G.; Diarrassouba, F.; Pritchard, J.; Masson, L.; Brousseau, R.; Bonnet, C.; Delaquis, P.; Bach, S.; Skura, B.J.; et al. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 6566–6576

15. Diaz-Sanchez, S.; Moscoso, S.; de los Santos, F.S.; Andino, A.; Hanning, I. Antibiotic use in poultry: A driving force for organic poultry production. *Food Prot. Trends* 2015, 35, 440–447.
20. Cui, S.; Ge, B.; Zheng, J.; Meng, J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 4108–4111.
16. Dorado-García, A.; Smid, J.H.; van Pelt, W.; Bonten, M.J.M.; Fluit, A.C.; van den Bunt, G.; Wagenaar, J.A.; Hordijk, J.; Dierikx, C.M.; Veldman, K.T.; et al. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: A pooled analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, 73, 339–347.
17. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J.* 2018, 16.
18. Falgenhauer, L.; Imirzalioglu, C.; Oppong, K.; Akenten, C.W.; Hogan, B.; Krumkamp, R.; Poppert, S.; Levermann, V.; Schwengers, O.; Sarpong, N.; et al. Detection and characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* from humans and poultry in Ghana. *Front. Microbiol.* 2019, 9, 3358.
19. Fanatico, A.C.; Owens, C.M.; Emmert, J.L. Organic poultry production in the United States: Broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 2009, 18, 355–366.
20. Gregova, G.; Kmetova, M.; Kmet, V.; Venglovsky, J.; Feher, A. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2012, 19, 75–77.
21. Hanon, J.B.; Jaspers, S.; Butaye, P.; Wattiau, P.; Méroc, E.; Aerts, M.; Imberechts, H.; Vermeersch, K.; Van der Stede, Y. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011–2014). *Prev. Vet. Med.* 2015, 122, 443–452.
22. Hricová, K.; Röderová, M.; Pudová, V.; Hanulík, V.; Halová, D.; Julínková, P.; Dolejšká, M.; Papoušek, I.; Bardoš, J. Quinolone-Resistant *Escherichia coli* in poultry farming. *Cent. Eur. J. Public Health* 2017, 25, 163–167.
23. Jiménez-Belenguer, A.; Doménech, E.; Villagrà, A.; Fenollar, A.; Ferrús, M.A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. *Avian Pathol.* 2016, 45, 501–507.
24. Kim, Y.J.; Park, J.H.; Seo, K.H. Comparison of the loads and antibiotic-resistance profiles of *Enterococcus* species from conventional and organic chicken carcasses in South Korea. *Poult. Sci.* 2018, 97, 271–278.
25. Koutsianos, D.; Gantelet, H.; Franzo, G.; Lecoupeur, M.; Thibault, E.; Cecchinato, M.; Koutoulis, K.C. An assessment of the level of protection against colibacillosis conferred by several autogenous and/or commercial vaccination programs in conventional pullets upon experimental challenge. *Vet. Sci.* 2020, 7, 80.
26. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 2013, 13, 1057–1098.
27. Lazarus, B.; Paterson, D.L.; Mollinger, J.L.; Rogers, B.A. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 60, 439–452.

28. Ljubojević, D.; Radosavljević, V.; Milanov, D. The role of gulls (Laridae) in the emergence and spreading of antibiotic resistance in the environment. *World Poult. Sci. J.* 2016, 72, 853–864.
29. Miranda, J.M.; Vázquez, B.I.; Fenti, C.A.; Calo-Mata, P.; Cepeda, A.; Franco, C.M. Comparison of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* strains isolated from organic and conventional poultry meat. *J. Food Prot.* 2008, 71, 2537–2542.
30. Mollenkopf, D.F.; Cenera, J.K.; Bryant, E.M.; King, C.A.; Kashoma, I.; Kumar, A.; Funk, J.A.; Rajashekara, G.; Wittum, T.E. Organic or antibiotic-free labeling does not impact the recovery of enteric pathogens and antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from fresh retail chicken. *Foodborne Pathog. Dis.* 2014, 11, 920–929.  
NAQS Environmentfriendly Agricultural Products Certification. Available online: <http://www.enviagro.go.kr/portal/en/main.do>
31. Nhung, N.T.; Chansiripornchai, N.; Carrique-Mas, J.J. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. *Front. Vet. Sci.* 2017, 4, 126. [CrossRef] [PubMed] *Animals* 2020, 10, 1215 12 of 12 50.
32. Parker, D.; Sniatynski, M.K.; Mandrusiak, D.; Rubin, J.E. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from wild birds in Saskatoon, Canada. *Lett. Appl. Microbiol.* 2016, 63, 11–15.
33. International Standard Organisation. Horizontal Method for Glucuronidase Positive *Escherichia Coli* Counting-Part 2; BAS EN ISO 16649-2:2001; ISO: Geneva, Switzerland, 2009.
34. Peduzzi, P.; Concato, J.; Feinstein, A.R.; Holford, T.R. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis II. Accuracy and precision of regression estimates. *J. Clin. Epidemiol.* 1995, 48, 1503–1510.
35. Persoons, D.; Haesebrouck, F.; Smet, A.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Martel, A.; Catry, B.; Berge, A.C.; Butaye, P.; Dewulf, J. Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. *Epidemiol. Infect.* 2011, 139, 765–771.
36. Projahn, M.; Daehre, K.; Semmler, T.; Guenther, S.; Roesler, U.; Friese, A. Environmental adaptation and vertical dissemination of ESBL-/pAmpC-producing *Escherichia coli* in an integrated broiler production chain in the absence of an antibiotic treatment. *Microb. Biotechnol.* 2018, 11, 1017–1026.
37. Rizzo, L.; Manaia, C.; Merlin, C.; Schwartz, T.; Dagot, C.; Ploy, M.C.; Michael, I.; Fatta-Kassinos, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 2013, 447, 345–360.
38. Tadesse, D.A.; Zhao, S.; Tong, E.; Ayers, S.; Singh, A.; Bartholomew, M.J.; McDermott, P.F. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 741–749.
39. van den Bogaard, A.E.; Stobberingh, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2000, 14, 327–335.
40. Wassenaar, T.M. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implications for human health. *Crit. Rev. Microbiol.* 2005, 31, 155–169.
41. World Health Organization (WHO). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th Revision; WHO: Geneva, Switzerland, 2019.
42. Wright, G.D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13, 589–594.

# STUDIO DEI FATTORI DI VIRULENZA E PROFILO DI ANTIMICROBICO-RESISTENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE DA CONSUMO

Rossini R.<sup>3</sup>, Gambi L.<sup>1</sup>, Menandro M.L.<sup>2</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Paola M.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, D’Incau M.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna, Sede territoriale di Forlì, Via Don Eugenio Servadei 3E/F, 47122 Forlì (FC), Italia;

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

<sup>3</sup> Medico Veterinario Libero Professionista.

## Summary

Colibacillosis is the most frequent bacterial disease in avian species: it induces significant economic losses on industrial poultry breeding, especially if characterized by a long production cycles like those of laying hens, in which the disease tends to become endemic and it is difficult to eradicate. Management strategies and the use of antibiotic treatments are essential for the control of the infection. However, over the years, there has been an increase in the isolation of *Escherichia coli* strains with multiple resistance to various classes of antimicrobials, which turns out to be a serious problem for the breeders but also for the public health. In this study antimicrobial resistance feature, the serogroup and the presence of APEC virulence genes have been investigated in *E. coli* strains isolated during outbreaks of colibacillosis in laying hens from intensive farming located in Emilia Romagna and in other Italian regions. The relationship of the results of each parameters was evaluated. A total of 71 *E. coli* strains were, therefore, subjected to serotyping for the identification of serogroup (based on somatic antigen “O”), to PCR to detect the presence of virulence genes and to Kirby Bauer antimicrobial susceptibility test. A statistical study was also carried out to evaluate a correlation between these parameters. The most frequently isolated serogroups were O2 (21%) and O88 (13%). Resistance was most frequently detected against nalidixic acid (49%) and ampicillin (38%) and all strains were sensitive to ceftiofur and florfenicol. Overall, 25% of the isolates showed resistance to at least three or more antimicrobials (MDR) and 56% of the isolates were defined APEC strains (presence of at least 5 virulence genes). The most frequently encountered virulence gene was *iss* (90% of cases), followed by *iucD* (85%), *cvi/cva* (70%), *irp2* (70%) and *tsh* (63%). On the other hand, virulence gene *astA* was detected in only 6% of the strains analyzed, followed by *papC* (14%) and *vat* (35%). The correlation between the different parameters (resistance genes, serotype and antimicrobial resistance) did not highlight particular associations. The comparison of the obtained results with those of similar studies highlights the importance of the continuous monitoring in order to have a real evaluation of the national epidemiological situation and, especially with regard to antimicrobial resistance, to be adopted the preventive measures with a view to a *One Health* approach towards APEC infections.

## INTRODUZIONE

La colibacillosi, è la malattia batterica più comune nel pollame ed è correlata ad

ingenti perdite economiche del settore avicolo. La problematica è particolarmente sentita negli allevamenti che prevedono cicli produttivi lunghi, come per la gallina ovaia, in relazione al fatto che tende ad endemizzare e divenire difficilmente debellabile. Per il controllo dell'infezione, risultano fondamentali adeguate strategie di *management* aziendale volte a ridurre l'impatto dei fattori predisponenti la malattia, ma spesso, è necessario il ricorso all'utilizzo di trattamenti con antimicrobici (Barnes et al., 2009; Camarda, 2009). Tuttavia, l'incremento dell'insorgenza dei ceppi di *Escherichia coli* con resistenze multiple nei confronti di varie classi di antimicrobici, favorisce il fallimento dei trattamenti terapeutici ed una pressione selettiva nei confronti dei ceppi resistenti (Sgariglia et al., 2019; Xu et al., 2019) indiscriminate use of antibiotics may lead to therapy failure and economic losses for the breeder. The aims of this study were to, determine the antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates, evaluate the correlation between *E. coli* isolation and systems of breeding included in this study, and identify the avian pathogenic *E. coli* (APEC. Ad oggi, l'antimicrobico-resistenza è considerata uno dei rischi più emergenti e preoccupanti per la salute pubblica a livello globale; per ridurre l'incidenza di questo fenomeno è fondamentale un approccio *OneHealth*, basato sulla stretta relazione tra la salute umana, animale ed ambientale (ECDC, 2019). Gli APEC (*Avian Pathogenic Escherichia coli*) più comunemente isolati in corso di colibacilloso, appartengono a vari sierogruppi tra cui O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 ed O115 (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999) polyserositis, septicemia and other mainly extraintestinal diseases in chickens, turkeys and other avian species. APEC are found in the intestinal microflora of healthy birds and most of the diseases associated with them are secondary to environmental and host predisposing factors. APEC isolates commonly belong to certain serogroups, O1, O2 and O78, and to a restricted number of clones. Several experimental models have been developed, permitting a more reliable evaluation of the pathogenicity of *E. coli* for chickens and turkeys. Hence, virulence factors identified on APEC are adhesins such as the F1 and P fimbriae, and curli, the aerobactin iron sequestering system, K1 capsule, temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh ed i ceppi isolati in Europa sono risultati nel 56,5% appartenenti a sei sierogruppi (O1, O2, O5, O8, O18 e O78) (Schouler et al., 2012) an extensive characterization of 1,491 *E. coli* isolates was conducted, based on serotyping, virulence genotyping, and experimental pathogenicity for chickens. The isolates originated from lesions of avian colibacillosis (n = 1,307. Attualmente, in letteratura non sono presenti molti studi che indagano la prevalenza dell'antimicrobico-resistenza negli *E. coli*, ed in particolare negli *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) in Italia (Sgariglia et al., 2019) indiscriminate use of antibiotics may lead to therapy failure and economic losses for the breeder. The aims of this study were to, determine the antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates, evaluate the correlation between *E. coli* isolation and systems of breeding included in this study, and identify the avian pathogenic *E. coli* (APEC. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare le caratteristiche fenotipiche relative al *pattern* di antimicrobico-resistenza, identificare il sierogruppo di appartenenza ed effettuare una valutazione genotipica dei geni di virulenza APEC in ceppi di *Escherichia coli* isolati da casi clinici di colibacilloso in galline ovaiole provenienti da allevamenti intensivi italiani, prevalentemente allocati in Emilia Romagna. Si è inoltre valutata l'eventuale correlazione tra i risultati ottenuti dai parametri studiati (antimicrobico-resistenza, sierogruppo, fattori di virulenza degli APEC).

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

In questo studio sono stati presi in considerazione 71 ceppi di *E. coli*, isolati da altrettanti episodi di malattia osservati in 32 diversi allevamenti intensivi di galline ovaiole distribuiti in 10 diverse regioni italiane (prevalentemente in Emilia Romagna), tra il 2018 ed il 2020.

### *Esame batteriologico ed identificazione batterica*

Dai campioni biologici prelevati in sede necroscopica o conferiti al laboratorio come pool di organi, è stato effettuato l'esame batteriologico per semina diretta su Agar Sangue e, per la crescita selettiva delle enterobatteriacee, su Hektoen Enteric Agar. In alcuni casi si è proceduto all'inoculo in brodo di arricchimento e successiva semina sui terreni solidi selettivi e differenziali. I terreni così inoculati sono stati incubati a 37°C per 24-48 ore in condizioni di aerobiosi; la successiva identificazione dei microrganismi sospetti è avvenuta con l'ausilio del sistema identificativo miniaturizzato Microgen™GnA+B-iDSYSTEM (Microgen Bioproducts Ltd, UK).

### *Caratterizzazione antigene somatico*

I ceppi di *E. coli* isolati sono stati sottoposti alla caratterizzazione sierologica per l'identificazione dell'antigene somatico. La metodica utilizzata permette di valutare la presenza di 30 differenti antigeni somatici (O1, O2, O5, O8, O9, O15, O18, O20, O22, O26, O45, O49, O55, O64, O78, O86, O88, O101, O103, O111, O113, O118, O128, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157) attraverso la tecnica sierologica di agglutinazione lenta a caldo mediante l'impiego di antisieri. Quando la prova risulta positiva per uno solo degli antisieri il ceppo viene considerato appartenente al sierogruppo omologo. Per le titolazioni il ceppo viene considerato appartenente al sierogruppo il cui antisiero ha agglutinato a titolo d'uso o ad una diluizione inferiore. Qualora 5 o più antisieri risultino positivi alla reazione di agglutinazione o se il controllo negativo risulta non favorevole, il ceppo è considerato autoagglutinante e il sierogruppo non determinabile (ND).

### *Antibiogramma*

L'antibiogramma è stato effettuato sui 71 ceppi isolati secondo la metodica di Kirby-Bauer, in conformità con le linee guida nazionali del Centro di Referenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Dei 71 ceppi di *E. coli* del presente studio, 69 sono stati analizzati secondo la suddetta metodica per valutare la resistenza o sensibilità ai seguenti antimicrobici: acido nalidixico (30 µg), aminosidina (60 µg), amoxicillina/acido clavulanico (10/20 µg), ampicillina (10µg), apramicina (15µg), cefalotina (30 µg), ceftiofur (30µg), colistina solfato (10 µg), enrofloxacin (5 µg), florfenicolo (30µg), gentamicina (10µg), kanamicina (30µg), tetraciclina (30 µg), yrimethoprim/sulfonamidi (1,25/23,75 µg). Invece 2 dei 71 ceppi sono stati valutati per tutti gli antimicrobici ad esclusione del Trimethoprim associato ai sulfonamidi. L'interpretazione dei risultati è avvenuta secondo quanto previsto dalle linee guida nazionali del Centro di Referenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, OIE Manual 2012, VET-S2).

### Individuazione dei geni APEC

Nel corso dello studio è stata effettuata un'analisi biomolecolare tramite PCR tradizionale per la ricerca dei geni di virulenza degli APEC, attraverso l'utilizzo del kit Kylt® APEC (AniCon Labor GmbH, DE), seguendo le indicazioni fornite dal produttore. La lettura delle bande di migrazione ottenuta dopo la corsa elettroforetica in gel di agarosio, è avvenuta utilizzando UVITEC della Cambridge®, interpretando l'immagine ottenuta con lo schema fornito dal produttore nel manuale Kylt® APEC, riportato nella tabella seguente (tabella 1).

n. di Bande del Controllo Positivo	Gene amplificato	Dimensione dell'amplificato
1	<i>astA</i>	111 bp
2	<i>iss</i>	309 bp
3	<i>irp2</i>	413 bp
4	<i>pap C</i>	501 bp
5	<i>cvi / cva</i>	598 bp
6	<i>iucD</i>	693 bp
7	<i>tsh</i>	824 bp
8	<i>vat</i>	978 bp

**Tabella 1:** chiave di lettura delle bande ottenute con elettroforesi del manuale Kylt® APEC. (AniCon Labor GmbH, DE)

### Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti sono stati organizzati in un database Excel. In aggiunta ai dati grezzi, sono state create delle ulteriori variabili composte, fra cui la classificazione dei ceppi in APEC (se presenti da 5 a più geni di virulenza) o *Multi Drug Resistant* (MDR, se presenti da 3 a più resistenze a diverse classi antimicrobiche). Diverse statistiche descrittive sono state calcolate al fine di valutare la distribuzione e l'associazione fra le caratteristiche di ceppi presi in esame. La correlazione fra le variabili in esame (i.e. geni di virulenza, antimicrobico resistenza, caratterizzazione del ceppo, etc.) è stata quantificata calcolando il *tau* di Goodman-Kruskal, una misura di associazione fra variabili categoriche che presenta la caratteristica di non essere simmetrica, utilizzando la libreria *GoodmanKruskal* in R.

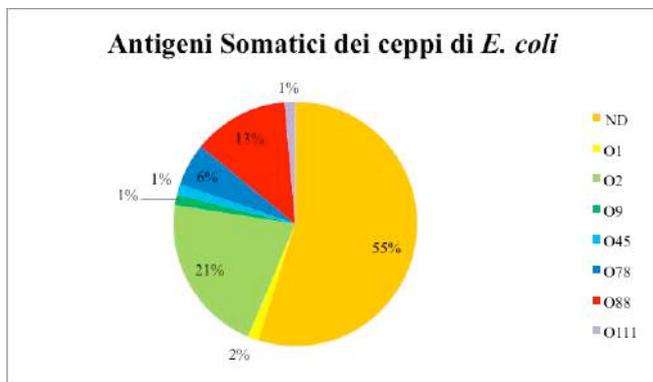
## RISULTATI

### Esame anatomo-patologico

Nell'83% dei casi (59 carcasse analizzate) le lesioni riscontrate sono riconducibili a colibacillosi sistemica con interessamento di più organi ed apparati: ovaio, milza, pericardio, fegato, intestino, cervello, cuore, polmoni, sacchi aerei, articolazioni plantari e tibiotarsiche. L'esame anatomo-patologico ha evidenziato quadri di aerossacculite (23%), pericardite (44%), epatite (54%), polisierosite fibrinosa (58%), enterite (34%), ovarite fibrinosa (75%), sinovite ed osteoartrite (8%) e meningite (9%).

### Ricerca antigene somatico

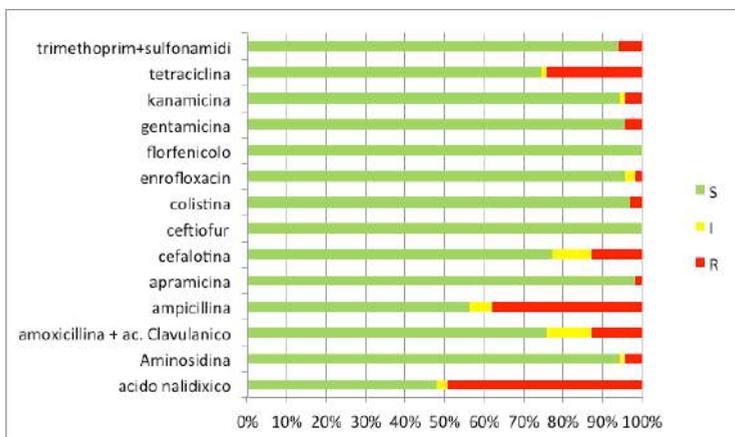
Dei 71 ceppi di *E. coli* sierotipizzati, il 55% non appartiene ai sierogruppi testati, mentre nel 21% (n.=15) dei casi, i ceppi sono risultati appartenenti al sierogruppo O2, per il 13% (n.=9) al sierogruppo O88 e per il 6% (n.=4) all'O78. I restanti ceppi (5%) sono risultati appartenere al sierogruppo O1, O9, O45, O111 (1 ceppo ognuno) (grafico 1).



**Grafico 1:** percentuale dei ceppi di *E. coli* che appartengono ad un determinato sierogruppo.

### Antibiogramma

Dalla valutazione degli antibiogrammi è emerso che le molecole antimicrobiche nei confronti delle quali i 71 ceppi presentano più frequentemente resistenza sono l'acido nalidixico, l'ampicillina e le tetracicline, mentre le molecole nei confronti delle quali la resistenza è nulla, o comunque molto bassa, sono il ceftiofur, il florfenicolo, l'apramicina ed l'enrofloxacin, come si evince dal grafico 2 e dalla tabella 2.

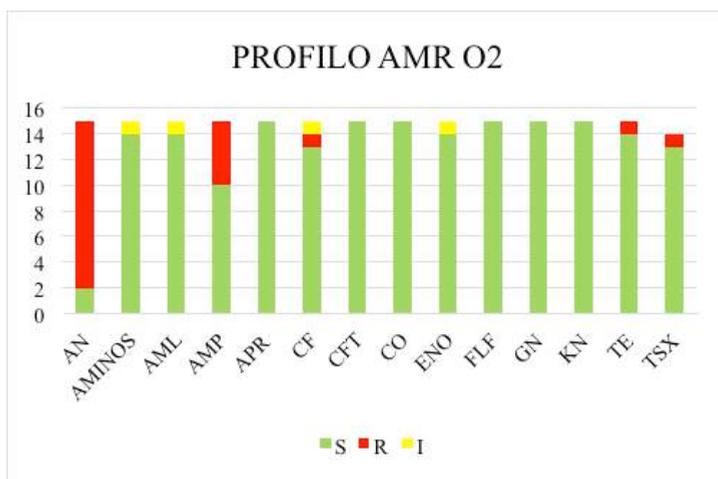


**Istogramma 2:** percentuali di ceppi di *E. coli* risultati sensibili, intermedi o resistenti nei confronti delle varie molecole antimicrobiche testate.

	S		I		R	
Acido Nalidixico	34	48%	2	3%	35	49%
Aminosidina	67	94%	1	1%	3	4%
Amoxicillina + Ac. Clavulanico	54	76%	8	11%	9	13%
Ampicillina	40	56%	4	6%	27	38%
Apramicina	70	99%	0	0%	1	1%
Cefalotina	55	77%	7	10%	9	13%
Ceftiofur	71	100%	0	0%	0	0%
Colistina	69	97%	0	0%	2	3%
Enrofloxacin	68	96%	2	3%	1	1%
Florfenicolo	71	100%	0	0%	0	0%
Gentamicina	68	96%	0	0%	3	4%
Kanamicina	67	94%	1	1%	3	4%
Tetraciclina	53	75%	1	1%	17	24%
Trimethoprim+Sulfonamidi	65	92%	0	0%	4	6%

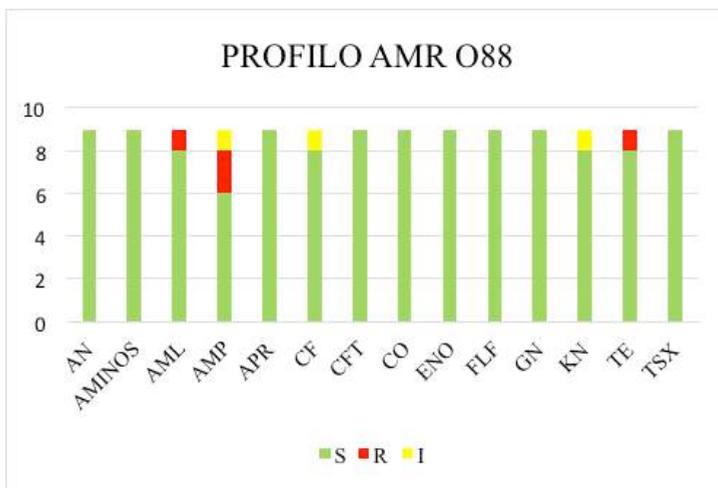
**Tabella 2:** numero e percentuale dei ceppi di *E. coli* risultati sensibili, ad intermedia sensibilità e resistenti nei confronti delle molecole antimicrobiche testate. Numero totale di ceppi analizzati 71.

Dei 71 ceppi esaminati, 18 (25%) sono risultati multiresistenti (MDR), quindi con resistenza nei confronti di più di 3 classi di antibiotici contemporaneamente. Dei 15 ceppi con sierogruppo O2, 13 sono risultati resistenti all'acido nalidixico (87%), 5 all'ampicillina (33%), 1 alle tetracicline (6%) ed 1a trimethoprim/sulfonamidi (6%); 1 ceppo ha mostrato una resistenza intermedia dei confronti dell'enrofloxacin, uno alla cefalotina, uno all'aminosidina ed infine uno all' amoxicillina/acido clavulanico. I ceppi con sierogruppo O2 isolati nel corso di questo studio sono risultati tutti sensibili nei confronti di apramicina, ceftiofur, colistina, florfenicolo, gentamicina e kanamicina (istogramma 3).



**Istogramma 3:** profilo di antimicrobico-resistenza dei ceppi di *E. coli* con sierogruppo O2, presi in considerazione nel presente studio, nei confronti delle molecole antimicrobiche testate.

Dei 9 ceppi con sierogruppo O88, 2 sono risultati resistenti all'ampicillina (22%), 1 all'aminosidina (11%) ed 1 alla tetraciclina (11%). Un ceppo ha dimostrato avere resistenza intermedia nei confronti di ampicillina, 1 alla cefalotina e un altro alla kanamicina. Infine, i ceppi con sierogruppo O88 isolati nel corso di questo studio sono risultati tutti sensibili all'acido nalidixico, amoxicillina/acido clavulanico, apramicina, ceftiofur, colistina, enrofloxacina, florfenicolo, gentamicina e trimethoprim/sulfonamidi (istogramma 4).



**Istogramma 4:** profilo di antimicrobico-resistenza dei ceppi di *E. coli* con sierogruppo O88, presi in considerazione nel presente studio, nei confronti delle molecole antimicrobiche testate.

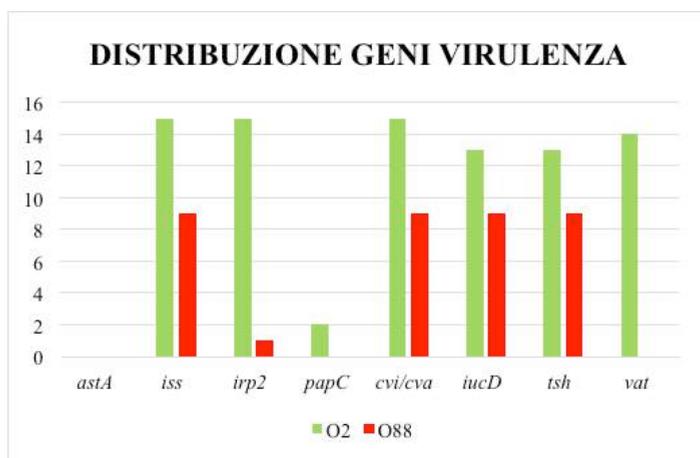
### Ricerca geni di virulenza

In seguito all'indagine biomolecolare eseguita tramite PCR, è emerso che 4 ceppi di *E. coli* sui 71 analizzati presentavano nel loro genoma il gene *AstA*, 64 il gene *iss*, 50 l'*irp2*, 10 il *papC*, 50 il gene *iucD*, 45 il *tsh* e 25 il gene *vat*. Il gene di virulenza più frequentemente riscontrato è stato *iss* (90% dei casi), seguito da *iucD* (85%), *cvi/cva* (70%), *irp2* (70%) e *tsh* (63%). Il gene di virulenza riscontrato più raramente invece è stato *astA*, presente nel 6% dei ceppi analizzati, seguito da *papC* (14%) e *vat* (35%) (tabella 3).

Geni	Ceppi di <i>E.coli</i>			
	Assenza		Presenza	
<i>AstA</i>	67	94%	4	6%
<i>iss</i>	7	10%	64	90%
<i>irp2</i>	21	30%	50	70%
<i>papC</i>	61	86%	10	14%
<i>cvi/cva</i>	21	30%	50	70%
<i>iucD</i>	11	15%	60	85%
<i>tsh</i>	26	37%	45	63%
<i>vat</i>	46	65%	25	35%

**Tabella 3:** numero e percentuale di ceppi di *E. coli* presi in considerazione nel presente studio che presentano o meno nel loro genoma un determinato gene di virulenza.

Secondo quanto riportato nel manuale kit Kylt® APEC, vanno considerati APEC i ceppi di *E. coli* che presentano almeno 5 geni di virulenza indagati con metodica biomolecolare. Sulla base di ciò è emerso che 40 ceppi su 71 (56%) isolati nel corso del presente studio risultano possedere 5 o più geni di virulenza e possono perciò essere definiti APEC.



**Istogramma 5:** numero di ceppi di *E. coli* appartenenti ai sierogruppi O2 e O88 che hanno presentato un determinato gene APEC di virulenza nel loro genoma.

Dei 15 ceppi con sierogruppo O2, nessuno ha presentato il gene *astA*, tutti hanno presentato i geni *iss*, *irp2* e *cvi/cva*, 13 ceppi ( 87%) hanno presentato i geni *iucD* e *tsh*, in 14 (93%) il gene *vat* e solo due il gene *papC* (13%) (Istogramma 5). Dei 9 ceppi con sierogruppo O88, nessuno ha presentato i geni *astA*, *papC* e *vat*, tutti hanno presentato i geni *iss*, *cvi/cva*, *iucD* e *tsh*; uno solo dei 9 ceppi ha dimostrato di presentare il gene *irp2* (11%) (istogramma 5). La distribuzione dei geni di virulenza nei due sierogruppi maggiormente rappresentati è tendenzialmente sovrapponibile per la presenza/assenza dei geni *astA*, *iss*, *cvi/cva*, *iucD* e *tsh*. Si discostano invece in quanto il sierogruppo O2 presenta i geni *papC* e *vat*, che vengono a mancare nel sierotipo O88 e per la prevalenza del gene *irp2*, sempre presente nei ceppi appartenenti al sierogruppo O2 e presente solo in un ceppo (11%) appartenente al sierogruppo O88 (istogramma 5). Inoltre, tutti i ceppi O2 hanno presentato almeno 5 fattori di virulenza, mentre solo 1 ceppo O88 ha presentato 5 geni di virulenza e tutti gli altri 4.

#### *Analisi statistica*

Calcolando il *tau* di Goodman-Kruskal, non si è evidenziata alcuna correlazione fra sierogruppi, fattori di virulenza e MDR. Tra i ceppi MDR è stato possibile evidenziare una maggiore probabilità di questi di essere ampicillina resistenti (0.64). Nessuna correlazione superiore a 0.5 è stata riscontrata tra l'appartenenza agli APEC e i geni di virulenza considerati.

## **DISCUSSIONE**

In Italia l'industria avicola è largamente sviluppata ed in costante crescita nell'ultimo decennio; in particolare l'allevamento della gallina ovaioia rappresenta un settore molto fiorente dell'economia italiana (ISMEA, 2020a; UNAITALIA, 2020). La colibacillosi è la malattia batterica più comune nel pollame ed è correlata ad ingenti perdite economiche del settore avicolo (Barnes et al., 2009; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Guabiraba & Schouler, 2015); è una problematica particolarmente sentita negli animali che presentano cicli produttivi lunghi, in quanto la malattia tende ad endemizzare e diviene quindi difficile da debellare (Camarda, 2009). Per il controllo dell'infezione, risultano fondamentali adeguate strategie di *management* aziendale volte a ridurre l'impatto dei fattori predisponenti la malattia, ma anche il ricorso all'utilizzo di trattamenti con antibiotici (Barnes et al., 2009; Camarda, 2009). Tuttavia, negli anni, si è assistito ad un incremento dell'isolamento di ceppi APEC con resistenze multiple nei confronti di vari classi di antimicrobici, che esita, di conseguenza, nella riduzione di efficacia dei trattamenti terapeutici e nella selezione dei ceppi resistenti (Sgariglia et al., 2019; Xu et al., 2019). In questo studio sono stati presi in considerazione 71 ceppi di *E. coli*, isolati da altrettanti episodi di malattia osservati in 32 diversi allevamenti intensivi di galline ovaiole distribuiti in 10 diverse regioni italiane (prevalentemente in Emilia Romagna), tra il 2018 ed il 2020. Nel 45% dei ceppi di *E. coli* è stato possibile identificare l'antigene somatico O; i sierogruppi più frequentemente isolati sono stati O2 (21%) e O88 (13%), che sono tra quelli maggiormente presenti in Europa (Schouler et al., 2012) e più frequentemente collegati a focolai di colibacillosi negli avicoli (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999) mentre risultano differenti da quello isolato con maggior frequenza in Oriente (O78) (Xu

et al., 2019). Il sierogruppo O78, nel corso di questo studio, è stato identificato solo nel 6% dei casi, attestandosi con una prevalenza inferiore a quella attesa, in quanto, solitamente, questo sierogruppo risulta essere tra i più frequentemente isolati nel corso di colibacillosi aviare (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Schouler et al., 2012). I restanti ceppi sono risultati appartenere al sierogruppi O1, O9, O45, O111. Il dato che emerge da questa valutazione, è l'estrema eterogeneità sierotipica degli *E. coli* e la cui prevalenza sembra dipendere dal singolo allevamento. Alla sierotipizzazione degli *E. coli* è stato associato lo studio dei fattori di virulenza eseguito con metodica biomolecolare. Alcuni autori hanno tentato di correlare il numero di geni di virulenza posseduti dai ceppi di *E. coli* e la possibilità di questi di causare patologia e hanno proposto che i ceppi debbano possedere almeno 5 geni di virulenza per essere considerati APEC (Rodriguez-Siek et al., 2005). Questa definizione deriva da studi epidemiologici sulla distribuzione di numerosi geni di virulenza effettuati su ceppi APEC e ceppi commensali enterici degli avicoli (*avian fecalis E. coli* - AFEC), con lo scopo di individuare un metodo biomolecolare rapido che possa aiutare nell'identificare gli APEC stessi (Cordoni et al., 2016; De Carli et al., 2015; Johnson et al., 2008). Nel presente studio, per la valutazione dei geni di virulenza è stato utilizzato un kit commerciale che ha permesso di evidenziare la presenza di 8 geni di virulenza. Nel 56% dei casi, i ceppi testati, sono risultati APEC sulla base della presenza di almeno 5 geni di virulenza. Questo dato è risultato maggiore rispetto a quello riscontrato in Centro Italia (31%) utilizzando lo stesso kit diagnostico (Sgariglia et al., 2019). Il gene di virulenza più frequentemente riscontrato è stato *iss* (90% dei casi), seguito da *iucD* (85%), *cvi/cva* (70%), *irp2* (70%) e *tsh* (63%). Il gene di virulenza riscontrato più raramente invece è stato *astA*, presente nel 6% dei ceppi analizzati, seguito da *papC* (14%) e *vat* (35%). Le prevalenze dei geni indagati, sono tendenzialmente simili a quelle riscontrate per gli stessi geni negli APEC isolati da episodi di colibacillosi del Centro Italia (Sgariglia et al., 2019). La distribuzione dei geni di virulenza nei due sierogruppi maggiormente rappresentati è tendenzialmente sovrapponibile per la presenza/assenza dei geni *astA*, *iss*, *cvi/cva*, *iucD* e *tsh*; si discostano invece in quanto il sierogruppo O2 presenta i geni *papC* e *vat*, che vengono a mancare nel sierotipo O88 e per la prevalenza del gene *irp2*, sempre presente nei ceppi appartenenti al sierogruppo O2 e presente solo nell'11% dei ceppi appartenenti al sierogruppo O88. Infine, tutti i ceppi appartenenti al sierogruppo O2 e solo un O88 sono risultati APEC secondo la definizione correlata alla presenza dei 5 geni di virulenza. Nel corso del presente studio gli *E. coli* sono stati testati nei confronti di 14 antibiotici. Tutti i ceppi sono risultati sensibili a ceftiofur e florfenicolo, invece sono risultati frequentemente resistenti all'acido nalidixico (49%) e all'ampicillina (38%). Altri studi hanno presentato risultati simili ma con tassi di resistenza più elevati (Bakhshi et al., 2017; Matin et al., 2017; Sgariglia et al., 2019; Shrestha et al., 2017; Subedi et al., 2018; Yang et al., 2004). Anche la resistenza alle tetracicline, nel presente studio, è risultata considerevole (24%), ma comunque inferiore a dati emersi nel corso di altri studi (Sgariglia et al., 2019; Vandemaële et al., 2002; Younis et al., 2017). La resistenza nei confronti di gentamicina e kanamicina non è risultata elevata (4%) e non si discosta tanto da quanto riscontrato in uno studio italiano del 2019 (Sgariglia et al., 2019), dato in contrasto con quanto riportato da altri autori che hanno registrato

tassi di resistenza maggiori (Yassin et al., 2017; Younis et al., 2017). La resistenza all'enrofloxacin è risultata bassa (1%), mentre in un recente studio italiano era risultata moderatamente alta (Sgariglia et al., 2019) e, ancor maggiore, in studi condotti in Oriente (Subedi et al., 2018; Yassin et al., 2017). La resistenza nei confronti di Trimethoprim/sulfonamidi si è attestata attorno al 6%, con un tasso nettamente inferiore a quanto riportato in altri studi (Sgariglia et al., 2019; Xu et al., 2019; Yassin et al., 2017). Nei confronti di amoxicillina/acido clavulanico il tasso di resistenza si è attestato al 13%, in linea con quanto riscontrato in Italia lo scorso anno (Sgariglia et al., 2019), mentre in altri studi la resistenza risulta essere decisamente maggiore (Younis et al., 2017) o nettamente inferiore (Yassin et al., 2017). I ceppi hanno mostrato una resistenza del 3% nei confronti della colistina, maggiore rispetto a quanto riportato in uno studio condotto in Medio Oriente (Bakhshi et al., 2017). I dati raccolti nel presente studio hanno dimostrato che i ceppi sono risultati poco resistenti (1%) all'azione di apramicina e aminosidina (4%), mentre per la cefalotina, è stata registrata una resistenza maggiore (13%). I sierogruppi O2 e O88 presentano due differenti profili di antimicrobico-resistenza. Il sierogruppo O2 è risultato nell'87% dei casi resistente all'acido nalidixico, mentre l'O88 risultava sensibile nei confronti di tale molecola. La resistenza nei confronti dell'ampicillina è risultata in entrambi i sierogruppi piuttosto elevata (33% in O2, 22% in O88), come anche quella nei confronti della tetraciclina (6% per O2, 11% per O88); il sierogruppo O2 presenta, inoltre una resistenza nei confronti di Trimethoprim/sulfonamidi, mentre il sierogruppo O88 all'aminosidina (11%). Dal presente studio emerge quindi un dato degno di attenzione, quale la totale sensibilità dei ceppi nei confronti di ceftiofur e la bassa resistenza nei confronti dell'enrofloxacin. Tali antimicrobici appartengono, infatti, rispettivamente alle cefalosporine di 3° generazione ed ai chinoloni, classi antimicrobiche di importanza critica anche per la salute umana e che pertanto devono essere sottoposte, in ambito veterinario, ad uso strettamente controllato. Il risultato ottenuto con i ceppi studiati è particolarmente incoraggiante anche in considerazione dei dati pubblicati dall'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) nel 2019 e relativi ai tassi di antimicrobico-resistenza del triennio 2015-2018, che riportavano un *trend* in aumento delle resistenze a tali classi da parte degli *E. coli* (ECDC, 2019). Inoltre, dal presente studio emerge che il tasso di antimicrobico-resistenza è tendenzialmente inferiore a quello registrato in Paesi Orientali (Matin et al., 2017; Shrestha et al., 2017; Subedi et al., 2018; Xu et al., 2019; Yang et al., 2004) e si avvicina maggiormente ai dati ottenuti in uno studio Italiano del 2019, ma anche in questo caso i ceppi MDR sono minori nel presente studio (25%) rispetto a quanto riscontrato nel Centro Italia (40%) (Sgariglia et al., 2019). Tale differenza potrebbe essere giustificata dal fatto che nel presente studio la valutazione dell'antibiotico-resistenza si riferisce all'allevamento della gallina ovaioia, mentre lo studio condotto in Centro Italia considera diverse tipologie di allevamento e specie avicole (Sgariglia et al., 2019). Contrariamente a quanto accade in altri Paesi, nei quali l'utilizzo di antibiotici risulta ancora molto frequente (Matin et al., 2017; Shrestha et al., 2017; Subedi et al., 2018; Xu et al., 2019; Yang et al., 2004) il sistema di allevamento avicolo, ed in particolare quello della gallina ovaioia da consumo presente in Italia, nel corso degli ultimi anni è migliorato in termini di biosicurezza e *management* aziendale, con conseguente

riduzione dei trattamenti antimicrobici da cui sembra derivare un calo della pressione selettiva a cui questi microrganismi sono sottoposti. Lo studio statistico di correlazione tra i diversi parametri (geni di resistenza, sierotipo e resistenza agli antimicrobici) non ha permesso di evidenziare particolari associazioni e tali parametri sembrano essere più legati al singolo allevamento e, per quanto riguarda i tassi di antimicrobico-resistenza alle pratiche manageriali.

## CONCLUSIONI

Lo studio dei ceppi APEC derivati da diverse tipologie di allevamento in termini biosicurezza e gestione aziendale in diverse aree geografiche, potrebbe permettere di comprendere come i ceppi di *Escherichia coli* evolvano nel tempo e dare quindi indicazioni sugli esiti derivanti dall'attuazione delle pratiche volte al miglioramento del *management* e dall'applicazione delle direttive sulla riduzione degli antimicrobici, aspetti fondamentali per gli allevatori e per gli organi competenti in Sanità Pubblica sul territorio, finalizzati alla pianificazione di azioni nell'ottica di un approccio *OneHealth*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bakhshi, M., Fatahi Bafghi, M., Astani, A., Ranjbar, V. R., Zandi, H., & Vakil, M. (2017). Antimicrobial Resistance Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in Yazd, Iran. *Journal of food quality and hazards control*, 4(3), 74–78.
2. Barnes, H. J., Nolan, L. K., & Vaillancourt, J. P. (2009). Colibacillosis. In *Diseases of Poultry* (12° Edizione, pagg. 691–737). J. M. Saif.
3. Camarda, A. (2009). Infezioni da *Escherichia Coli*. In *Manuale di Patologia Aviaria* (1° Edizione, pagg. 77–83). Le Point Veterinarie SRL.
4. CLSI VET01-A4: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard- Fourth Edition July 2013.
5. CLSI M100-S23 2013 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Teststing; Twenty-Third Informational Supplement January 2013.
6. CLSI M100-S25 2013 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Teststing; Twenty-Fifth Informational Supplement January 2015.
7. Cordoni, G., Woodward, M. J., Wu, H., Alanazi, M., Wallis, T., & La Ragione, R. M. (2016). Comparative genomics of European avian pathogenic *E. Coli* (APEC). *BMC genomics*, 17(1), 960.
8. De Carli, S., Ikuta, N., Lehmann, F. K. M., da Silveira, V. P., de Melo Predebon, G., Fonseca, A. S. K., & Lunge, V. R. (2015). Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poultry Science*, 94(11), 2635–2640.
9. Dho-Moulin, M., & Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30(2–3), 299–316.
10. ECDC, E. C. for D. P. and C. (2019). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018—Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018*.
11. Guabiraba, R., & Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: Still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15).

12. ISMEA, I. di S. per il M. A. Al. (2020a). Report ISMEA Tendenze avicoli: Panoramica sull'annata 2019. *Tendenze avicoli*.
13. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(12), 3987–3996.
14. Matin, M. A., Islam, M. A., & Khatun, M. M. (2017). Prevalence of colibacillosis in chickens in greater Mymensingh district of Bangladesh. *Veterinary World*, *10*(1), 29–33.
15. OIE Manual 2012 Laboratory Methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing.
16. Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*, *36*(2), 241–256.
17. Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J., & Moulin-Schouleur, M. (2012). Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(5), 1673–1678.
18. Sgariglia, E., Aconiti Mandolini, N., Napoleoni, M., Medici, L., Fraticelli, R., Conquista, M., Gianfelici, P., Staffolani, M., Fisichella, S., Capuccella, M., Sargenti, M., & Perugini, G. (2019). Antibiotic resistance pattern and virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from different breeding systems. *Veterinaria Italiana*, *55*(1), 26–33.
19. Shrestha, A., Bajracharya, A. M., Subedi, H., Turha, R. S., Kafle, S., Sharma, S., Neupane, S., & Chaudhary, D. K. (2017). Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. *BMC Research Notes*, *10*(1), 574.
20. Subedi, M., Luitel, H., Devkota, B., Bhattarai, R. K., Phuyal, S., Panthi, P., Shrestha, A., & Chaudhary, D. K. (2018). Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC veterinary research*, *14*(1), 113.
21. UNAITALIA, U. N. F. A. C. e U. (2020). Annata avicola 2019. *UNAITALIA Informa*. <https://www.unaitalia.com/mercato/annata-avicola/>
22. Vandemaele, F., Vereecken, M., Derijcke, J., & Goddeeris, B. (2002). Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. *Veterinary Record*, *151*(12), 355–356.
23. VET-S2: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Second Informational Supplement July 2013.
24. Xu, X., Sun, Q., & Zhao, L. (2019). Virulence Factors and Antibiotic Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Eastern China. *Journal of Veterinary Research*, *63*(3), 317–320.
25. Yang, H., Chen, S., White, D. G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., & Meng, J. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Diseased Chickens and Swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(8), 3483–3489.

26. Yassin, A. K., Gong, J., Kelly, P., Lu, G., Guardabassi, L., Wei, L., Han, X., Qiu, H., Price, S., Cheng, D., & Wang, C. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PLOS ONE*, *12*(9), e0185326.
27. Younis, G., Awad, A., & Mohamed, N. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Veterinary World*, *10*(10), 1167–1172.

## BATTERI ENTEROPATOGENI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEL GABBIANO REALE (*Larus michahellis*)

Russo T.P.<sup>1</sup>, Dipineto L.<sup>1</sup>, Borrelli L.<sup>1</sup>, Varriale L.<sup>1</sup>, Pace A.<sup>1</sup>, Minichino A.<sup>1</sup>, Pompameo M.<sup>2</sup>, Menna L.F.<sup>1</sup>, Santaniello A.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, via F. Delpino 1, 80137 Napoli (NA), Italia;

<sup>2</sup> Presidio Ospedaliero Veterinario, ASL Napoli 1 Centro, strada Comunale del Principe 13a, 80145 Napoli (NA), Italia

### Summary

The yellow-legged gull (*Larus michahellis*) is an omnivorous and opportunistic species that feeds in natural habitats, such as seashores, lakes, and rivers, as well as in farmlands and urban surroundings. Large gulls (*Larus* sp.) are often implicated in the dissemination of several enteric diseases, mainly due to their large population size and their exploitation of landfills. This study was aimed at estimating the role of yellow-legged gull as a potential reservoir of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Yersinia* spp. and at evaluating the antimicrobial resistance of isolated strains. A total of 225 yellow-legged gulls, recovered at the public Wildlife Rescue and Rehabilitation Centre of University of Naples Federico II, were analysed. Enteropathogenic bacteria were isolated from 96/225 (42.67%) gulls examined. In particular, *Campylobacter* spp. was isolated from 60/225 (26.67%) birds and identified as *C. coli* (36/60; 60%) and as *C. jejuni* (24/60; 40%). *Salmonella* spp. was isolated from 3/225 samples (1.33%), and all strains were identified as *Salmonella arizonae*. STEC were recovered in 30/225 (13.3%) samples and serotyped as *E. coli* O128 (40%), O26 (30%), O157 (20%) and O11 (10%); *Yersinia* spp. was never isolated.

All isoaltes exhibited antimicrobial resistance to several molecules, including critically important antimicrobials (i.e. quinolones, tetracyclines) and multidrug resistance. Our results highlight the importance of yellow-legged gulls as potential reservoirs of pathogenic and resistant strains and their role in the maintenance and transmission of these bacteria in the environment, with potential implications for public health.

### INTRODUZIONE

Il gabbiano reale zampegiale (o gabbiano reale mediterraneo) (*Larus michahellis*) è considerato un animale opportunisto in grado di adattarsi a differenti tipi di ambiente. La popolazione italiana del gabbiano reale, così come in molti altri paesi del mediterraneo, ha subito un forte incremento durante la seconda metà del 1900. La popolazione nidificante, stimata in 24.000-27.000 coppie nidificanti nel 1983, ha raggiunto 45.000-60.000 coppie all'inizio del 2000, mostrando un aumento del 58-125%. Tale incremento sembrerebbe legato prevalentemente a due fattori: la diminuzione della persecuzione diretta dell'uomo sulle colonie di gabbiani e l'aumento delle risorse trofiche legate alle attività antropiche (Serra et al., 2016). In aggiunta, diversi report considerano questi volatili dei potenziali vettori di alcuni agenti patogeni nonché ospiti di mantenimento di batteri antibioticoresistenti

(Franklin et al., 2020) come riportato da diverse indagini condotte in differenti paesi europei (Moore et al., 2002; Stedt et al, 2014; Migura and Garcia et al., 2017; Moré et al., 2017; Barguigua et al., 2019). Tuttavia, sono presenti pochi studi analoghi effettuati in Italia su questa tematica. La presente indagine, pertanto, è stata condotta con l'obiettivo di esaminare il ruolo del gabbiano come potenziale vettore di agenti zoonotici nonché come potenziale reservoir di ceppi antibioticoresistenti. Nello specifico, questo studio ha focalizzato l'attenzione sulle popolazioni di gabbiano reale zampegiale nella città di Napoli al fine di valutare la prevalenza di *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* produttori di shigatossine e *Yersinia* spp., e di stimarne la relativa antibioticoresistenza.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Durante il periodo Aprile/Luglio del quadriennio 2016-2019, sono stati esaminati 225 gabbiani reale zampegiale provenienti dal Centro di Recupero Animali Selvatici dell'Università Federico II di Napoli. I volatili venivano campionati al momento del loro arrivo al Centro dove veniva eseguito, su ciascuno di essi, un tampone cloacale. I tamponi venivano inoculati in phosphate-buffered saline (PBS) e trasportati a +4°C al laboratorio del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli Federico II.

### *Isolamento e identificazione batterica*

I campioni sono stati processati al fine di isolare *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* produttori di shigatossine (STEC) e *Yersinia* spp. In particolare, per ciascun batterio, una aliquota (100 µl) di PBS veniva utilizzata per l'isolamento mediante tecniche colturali. L'identificazione è stata eseguita mediante PCR e tecniche sierologiche. Gli isolati di *Salmonella* spp. sono stati tipizzati dal Centro di referenza nazionale e Laboratorio di referenza OIE per le salmonellosi (IZSVe).

### *Antibiogramma*

Tutti i ceppi venivano sottoposti ad antibiogramma mediante la tecnica di diffusione in agar (Kirby-Bauer) seguendo i criteri descritti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). I ceppi di *Campylobacter* spp. venivano testati nei confronti di azitromicina (AZM 15 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloramfenicolo (CHL 30 µg), doxiciclina (DO 30 µg), eritromicina (E 15 µg), enrofloxacina (ENR 5 µg), gentamicina (CN 10 µg), acido nalidixico (NA 30 µg) e tetraciclina (TE 30 µg). *Salmonella* e STEC venivano testati nei confronti di ampicillina (AMP 10 µg), amoxicillina (AMO 30 µg), amoxicillina-clavulanato (AMC 20+10 µg), apramicina (APR 40 µg), ceftazidime (CAZ 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloramfenicolo (CHL 30 µg), colistina solfato (10 µg), doxiciclina (DO 30 µg), enrofloxacina (ENR 5 µg), gentamicina (CN 10 µg), acido nalidixico (NA 30 µg) streptomina (S 10 µg), sulfonamide (S3 300 µg), tetraciclina (TE 30 µg) e sulfamethoxazolo-trimethoprim (SXT 1,25+23,75 µg). Per tutti i ceppi, gli aloni di inibizione venivano misurati e valutati come sensibili, intermedi e resistenti seguendo i criteri CLSI ed EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Al fine di valutare la presenza di batteri ESBL (Extended

Spectrum Beta-Lactamase), tutti i ceppi venivano anche sottoposti al combination disk diffusion test, usando cefpodoxime (CPD; 10 µg; Oxoid), cefpodoxime/acido clavulanico (CD; 10/1 µg; Oxoid), e ETEST® ESB (ESBL CT/CTL 16/1; bioMérieux).

## RISULTATI

I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di batteri enteropatogeni in 96/225 [42,67%; 95% intervallo di confidenza (IC) = 36,38–49,2 %] gabbiani esaminati. Non sono state registrate coinfezioni (tabella 1).

*Campylobacter* spp. è stato isolato da 60/225 (26,67%; 95% IC = 21.38- 32.80%) campioni. Tra questi, 36/60 (60%) venivano identificati come *C. coli* e 24/60 (40%) come *C. jejuni*. Tutti i *Campylobacter* testati risultavano sensibili al cloramfenicolo e alla gentamicina. Le maggiori percentuali di resistenza venivano registrate per la tetraciclina (62,5% per *C. jejuni* e 52,78% per *C. coli*), ciprofloxacina (37,5% e 33,3%) e per l'acido nalidixico (37,5% e 27,7%).

In particolare, 9/36 (25%) *Campylobacter coli* erano resistenti alla tetraciclina e ciprofloxacina, 3/36 (8,3%) alla tetraciclina, ciprofloxacina ed eritromicina, e 3/36 (8,3%) era anche resistente all'acido nalidixico e all'azitromicina; 6/24 (25%) *Campylobacter jejuni* erano resistenti all'azitromicina, ciprofloxacina e tetraciclina, 4/24 (33,3%) all'eritromicina e 2/24 (8,3%) erano anche resistenti all'acido nalidixico.

*Salmonella* spp. veniva isolata da 3/225 (1,33%; 95% IC = 0,0045 – 0,0384 %) campioni; tutti i ceppi sono stati sierotipizzati come *Salmonella arizonae* e 2/3 (66,6 %) risultava resistente alla sulfonamide.

*E. coli* produttori di shigatossine venivano isolati da 30/225 (13.3%; 95% IC = 9.5 – 18.3%) gabbiani e sierotipizzati come *E. coli* O128 (n=12; 40%), *E. coli* O26 (n=9; 30%), *E. coli* O157 (n=6; 20%) ed *E. coli* O11 (n=3; 10%). Come evidenziato dalla PCR, il 100% dei ceppi veicolava i geni *stx1*, *stx2* ed *eae*. Tutti gli STEC erano sensibili al cloramfenicolo. Le maggiori percentuali di resistenza si registravano per la tetraciclina (56,6%), seguita dalla ampicillina (50%) e poi dalla ciprofloxacina (33,3%). Undici (36.6%) STEC isolati erano resistenti alla tetraciclina e all'ampicillina e 4 erano resistenti anche all'enrofloxacin. Il 6,67% dei 30 STEC isolati mostravano resistenza alla tetraciclina, ampicillina e sulfamethoxazolo-trimethoprim. Due (6,67%) *E. coli* O26 erano positivi al test ESB. I campioni processati per *Yersinia* spp. risultavano costantemente negativi.

## DISCUSSIONE

Sono stati condotti diversi studi sulla prevalenza di batteri enteropatogeni nei gabbiani con risultati eterogenei dovuti anche alle diverse specie di gabbiani esaminati. Nella nostra indagine, *Campylobacter* spp. veniva isolato da 60/225 volatili e *C. coli* risultava la specie predominante. Tali risultati si discostano da quelli rilevati in studi simili dove il ceppo di *Campylobacter* spp. maggiormente isolato risultava *C. jejuni* (Moré et al. 2017; Migura-Garcia et al. 2017; Broman et al. 2002). Per quel che concerne l'antibioticoresistenza, le più alte percentuali sono state registrate nei confronti di tetraciclina (56,6%), ciprofloxacina (35%), acido nalidixico (31,67%) ed enrofloxacin (30%). Inoltre, il 22% dei *Campylobacter* spp. isolati mostrava anche fenomeni di multiresistenza (*i.e.* resistente a 3 o più

classi di antibiotici). Questi risultati si discostano da quelli ritrovati in altri paesi in cui non si evidenziava resistenza all'eritromicina né tantomeno multiresistenza (Moré et al., 2017; Migura-Garcia et al., 2017). Nella nostra indagine, *Salmonella* spp. è stata isolata nel 1,33% dei campioni esaminati, evidenziando alti tassi di sensibilità agli antibiotici testati. Tali risultati sono notevolmente più bassi di altri studi in cui la prevalenza di *Salmonella* oscilla dal 30% al 60% (Moré et al., 2017; Migura-Garcia et al., 2017) con alti tassi di antibioticoresistenza. Le discordanze tra i nostri risultati con quelli degli altri studi consultati potrebbero essere legate alle differenti specie di gabbiani esaminate e alle diverse circostanze geografiche così come alle loro condizioni di vita, alle abitudini di foraggiamento, e all'eventuale approvvigionamento da discariche di rifiuti.

In merito agli isolamenti di *E. coli*, i ceppi isolati dalla presente indagine veicolavano tutti i geni *stx1*, *stx2*, codificanti la produzione di shigatossine e il gene *eae*, collegato alla patogenicità. Inoltre, il 76,6% degli isolati era resistente ad almeno 2 antibiotici e 9 ceppi mostravano resistenza ad almeno 3 antibiotici. Le maggiori percentuali di resistenza si registravano nei confronti di tetraciclina e ampicillina in linea con gli studi condotti da Barguigua et al. (2010) e Stedt et al. (2014). In aggiunta, sebbene *Yersinia* spp. non sia mai stata isolata nella presente indagine, quando isolata nel gabbiano, da studi analoghi, ha mostrato sempre bassa patogenicità e virulenza (Niskanen et al., 2003) ponendo al minimo il potenziale rischio per la salute pubblica.

In conclusione, il presente studio conferma il gabbiano come potenziale vettore e diffusore di batteri enteropatogeni con differenti gradi di antibioticoresistenza. Ciò risulta di particolare rilievo nelle zone costiere delle città urbanizzate in cui la popolazione di gabbiani è in continua crescita e laddove tali volatili potrebbero entrare in stretto contatto con l'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barguigua A, Rguibi Idrissi H, Nayme K, Timinouni M. (2019). Virulence and Antibiotic Resistance Patterns in *E. coli*, Morocco. *Ecohealth*. 16(3):570-575.
2. Broman T, Palmgren H, Bergström S, Sellin M, Waldenström J, Danielsson-Tham ML, Olsen B. (2002). *Campylobacter jejuni* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): prevalence, genotypes, and influence on *C. jejuni* epidemiology. *J Clin Microbiol*. 40(12):4594-4602.
3. Franklin AB, Ramey AM, Bentler KT, Barrett NL, McCurdy LM, Ahlstrom CA, Bonnedahl J, Shriner SA, Chandler JC. (2020). Gulls as Sources of Environmental Contamination by Colistin-resistant Bacteria. *Sci Rep*. 10(1):4408.
4. Migura-Garcia L, Ramos R, Cerdà-Cuéllar M. (2017). Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serovars and *Campylobacter* spp. Isolated from an Opportunistic Gull Species, Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*). *J Wildl Dis*. 53(1):148-152.
5. Moore JE, Gilpin D, Crothers E, Canney A, Kaneko A, Matsuda M. (2002). Occurrence of *Campylobacter* spp. and *Cryptosporidium* spp. in seagulls (*Larus* spp.). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2(2):111-114.
6. Moré E, Ayats T, Ryan PG, Naicker PR, Keddy KH, Gaglio D, Witteveen M, Cerdà-Cuéllar M. (2017). Seabirds (Laridae) as a source of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and antimicrobial resistance in South Africa. *Environ*

- Microbiol. 19(10):4164-4176.
7. Niskanen T, Waldenström J, Fredriksson-Ahomaa M, Olsen B, Korkeala H. (2003). *virF*-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. *Appl Environ Microbiol.* 69(8):4670-4675.
  8. Serra L, Andreotti A, Kirov D, Nardelli R, Nissardi S, Pirrello S, Popov D, Sadooul N, Volponi S, Zucca C. (2016). Guidelines for management of the breeding populations of the Yellow-legged Gull *Larus michahellis* in the salt pans and coastal wetlands of the Mediterranean Project LIFE10NAT/IT/000256. ISPRA, Manuali e Linee Guida 144/2016.
  9. Stedt J, Bonnedahl J, Hernandez J, McMahon BJ, Hasan B, Olsen B, Drobni M, Waldenström J. (2014). Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infect Ecol Epidemiol.* 4:21565.



## **CONFRONTO TRA PIANI VACCINALI TRADIZIONALI E RHVT PER MALATTIA DI GUMBORO NEL BROILER: SIEROLOGIA E PERFORMANCE IN CAMPO**

Russo E., Boldini S.

*MSD Animal Health, Strada Olgia Vecchia snc Centro Direzionale Milano 2 Palazzo Canova, 20054, Segrate (MI), Italia.*

### **Summary**

Infectious bursal disease virus (IBDV) causes immunosuppression in birds and is characterized by the presence of different strains with different pathogenicity and clinical symptoms. In broilers IBD is controlled through vaccination, with live attenuated vaccines or turkey herpesvirus construct vaccines expressing IBDV VP2 protein. In this study 3 different vaccination plans were administered to broilers and compared: traditional live attenuated vaccine at 21 days (according to Deventer formula, group A), rHVT-ND-IBD half dose (group B), rHVT-ND-IBD full dose (group C). Weekly serological titers for IBD of 3 farms from group A, and 5 farms from groups B and C were compared. All birds came from the same breeders and the level of maternal antibodies was alike. Productive parameters (live weight, Mortality, FCR, treatment costs) were collected from a 3 months period of production with each vaccination plan and compared.

At 1 and 2 weeks of age group C had significantly higher titers ( $p < 0,01$ ) than groups A and B that showed a similar drop in serological titers. At 3 weeks group A had lower titers with some negative samples in all farms, groups B and C had similar titers. At 4 weeks group A had lower titers than groups B and C, but titers were rising, at 5, 6 and 7 weeks all groups had similar titers. The groups B and C never had negative samples, whereas group A had a period of susceptibility to IBD. In productive parameters there is a significant difference only for antibiotic treatment costs, that was significantly lower in group B than in the other two groups.

The group vaccinated with full dose had an earlier onset of immunity compared to half dose, this is very important for flocks with weak maternal immunity, and can lead to vaccination failure in birds vaccinated with partial dose.

These data discourage the use of reduced doses of the rHVT-ND-IBD vaccine.

### **INTRODUZIONE**

La Malattia di Gumboro o Bursite Infettiva (IBD) è una patologia immunosoppressiva che presenta come organo target la Borsa di Fabrizio. Al momento si conoscono 2 sierotipi di IBDV: sierotipo 1, patogeno con virulenza variabile a seconda del ceppo e sierotipo 2 avirulento (1).

L'unico modo per controllare IBDV ed evitare problemi di immunosoppressione nel pollo è la vaccinazione. Sul mercato al momento sono disponibili 2 grosse categorie di vaccini: i vaccini vivi attenuati (formulazione normale o ad immunocomplessi) e vaccini vettorizzati, che impiegano l'herpesvirus del tacchino (HVT) sia per immunizzare nei confronti della Malattia di Marek che per esprimere VP2, proteina molto immunogena di IBDV, in grado di indurre una risposta immunitaria anche nei confronti di IBD (2).

Per avere una buona protezione la qualità della vaccinazione è essenziale. Se si vaccina con vaccini tradizionali il momento in cui viene eseguita la vaccinazione è fondamentale: se si vaccina troppo presto gli anticorpi di origine materna possono bloccare il vaccino e rendere la vaccinazione inefficace, se al contrario si vaccina troppo tardi si rischia di lasciare una finestra di sensibilità a IBD. La "Formula di Deventer" è uno strumento che a partire dal titolo anticorpale dei pulcini di un giorno di età e del vaccino (vaccini meno attenuati riescono a superare prima la barriera data dagli anticorpi materni) è in grado di stimare la data ideale per la vaccinazione (3). Per quanto riguarda invece i vaccini rHVT, l'uso di dosi ridotte è una pratica adottata comunemente in campo per ridurre i costi, ma può avere effetti anche molto importanti sull'efficacia del vaccino (4, 5).

Lo scopo di questo studio è confrontare la risposta immunitaria nei confronti IBDV a seguito dell'impiego di 3 piani vaccinali differenti: vaccino tradizionale con data di vaccinazione determinata in base alla Formula di Deventer, vaccino rHVT-ND-IBD somministrato a dose dimezzata, vaccino rHVT-ND-IBD somministrato a dose intera.

## **MATERIALI E METODI**

In una azienda produttrice di broiler, nell'ambito di un monitoraggio diagnostico sierologico di routine a cadenza settimanale, sono state selezionate 13 aziende che hanno ricevuto pulcini provenienti dallo stesso gruppo di riproduttori e vaccinate con:

- Vaccino vivo attenuato tradizionale mild (3 aziende). Gli animali sono stati vaccinati in campo a 21 giorni (come da Formula di Deventer).

- Vaccinazione con rHVT-ND-IBD mezza dose sottocute a un giorno di età (5 aziende).

- Vaccinazione con rHVT-ND-IBD dose intera sottocute a un giorno di età (5 aziende).

Per ogni punto di prelievo sono stati analizzati 20 campioni utilizzando un kit ELISA commerciale (Synbiotics) per la titolazione di IBDV.

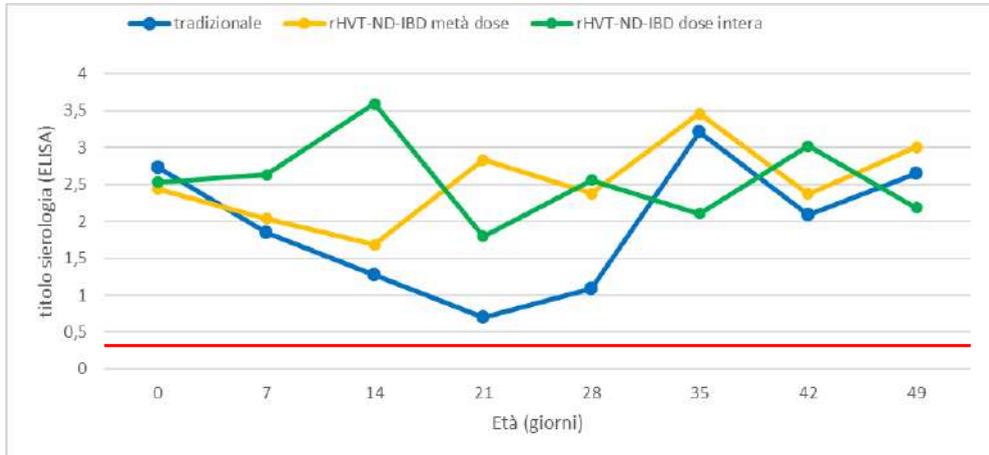
I tre piani vaccinali sono inoltre stati impiegati per la vaccinazione di circa 3.800.000 pulcini ciascuno per eseguire un confronto delle performance produttive (peso vivo, mortalità, FCR, costo dei trattamenti).

## **RISULTATI**

Tutti i pulcini avevano la medesima provenienza, ed infatti il livello degli anticorpi materni nei pulcini di 1 giorno è risultato uguale in tutti e tre i gruppi e piuttosto elevato (figura 1).

Nella figura 1 possiamo vedere illustrato il risultato della sierologia. Ad 1 e 2 settimane di età gli animali vaccinati con rHVT-ND-IBD a metà dose e quelli in attesa di essere vaccinati con il vaccino vivo attenuato hanno riportato un analogo calo di titolo anticorpale, mentre gli animali vaccinati rHVT-ND-IBD hanno mantenuto un titolo anticorpale costante e significativamente più alto di quello degli altri due gruppi ( $p < 0,01$ ). A 3 settimane il gruppo di animali che doveva ricevere il vaccino tradizionale ha avuto un ulteriore calo di titolo anticorpale e ha cominciato a presentare anche alcuni campioni negativi, mentre il gruppo vaccinato rHVT-ND-IBD mezza dose ha avuto un rialzo statisticamente significativo e ha raggiunto un livello simile a quello degli animali vaccinati rHVT-ND-IBD a dose intera, che si mantiene da questo punto in avanti. A 4 settimane d'età anche il gruppo con vaccinazione tradizionale inizia ad avere un rialzo del titolo e a 5 settimane raggiunge il livello degli altri due gruppi, per mantenerlo fino alla macellazione.

Per quanto riguarda le performance produttive il peso vivo, la mortalità e la FCR non hanno presentato differenze significative nei 3 gruppi, mentre il costo dei trattamenti si è dimostrato significativamente più basso nel gruppo che ha ricevuto rHVT-ND-IBD a dose intera (4,5 €/1000 animali) che negli altri due gruppi (6,2€/1000 animali rHVT-ND-IBD mezza dose; 6,4 €/1000 animali vaccino tradizionale).



**Figura 1.** Risultati della sierologia. Le 3 curve rappresentano la media dei titoli sierologici (test ELISA) nei confronti di IBDV nei tre gruppi vaccinati con: vaccino tradizionale (curva blu), rHVT-ND-IBD a metà dose (curva gialla) e rHVT-ND-IBD a dose intera (curva verde). La linea rossa rappresenta il limite di positività del test, mentre le lettere indicano la significatività statistica.

## DISCUSSIONE

Gli animali vaccinati con rHVT-ND-IBD ad entrambi i dosaggi, nei primi 28 giorni, hanno dimostrato una sieroconversione migliore del gruppo vaccinato con vaccino tradizionale, che ha presentato anche una finestra di mancata copertura. Gli animali vaccinati con rHVT-ND-IBD a dose intera hanno mostrato una risposta alla vaccinazione molto più rapida degli animali vaccinati con metà dose, che erano in ritardo di circa 15 giorni. In questo caso, dati i livelli anticorpali materni molto alti, questo non è stato un problema, ma in caso di immunità materna più contenuta rischia di causare un periodo di sensibilità alla malattia. Questo risultato conferma anche per i vaccini veicolizzati lo stesso rischio di ridotta efficacia già dimostrato in caso di vaccinazione con dosi ridotte di vaccini tradizionali per la malattia di Marek (4,5), ed è in linea con quanto emerso dalle performance produttive. Possiamo infatti vedere che il gruppo vaccinato rHVT-ND-IBD oltre ad avere i migliori titoli anticorpali presenta anche una spesa più bassa per i farmaci, che indica indirettamente un miglior stato di salute generale. Il risparmio economico ipotetico che si ha utilizzando la dose dimezzata viene quindi più che compensato da un aumento di costi del farmaco poi durante il ciclo.

## CONCLUSIONI

In conclusione, questi dati scoraggiano fortemente l'utilizzo di dosaggi inferiori a

quelli riportati nel foglietto illustrativo da un punto di vista clinico, ma anche di benessere animale ed economico.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Rosenberger J.K. & Cloud S.S. (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 D. J. (2017). Advances in vaccine research against economically important viral diseases of food animals: Infectious bursal disease virus. *Veterinary Microbiology*. 206:121–125.
3. Block H., Meyer-Block k., Rebeski D. E., Schar H., de Wit S., Rohn K., Rautenschlein S. (). A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathology* 36(5):401-9.
4. Gimeno I. M., Cortes A. L., Montiel E. R., Lemiere S., Pandiri A. K. R. (2011). Effect of Diluting Marek's Disease Vaccines on the Outcomes of Marek's Disease Virus Infection When Challenged with Highly Virulent Marek's Disease Viruses. *Avian Diseases* 55(2):263-272.
5. Islam A. F. M. F., Walkden-brown s. W., Groves P. J., Underwood G. J. (2007). Effects of vaccine dose, virus challenge dose and interval from vaccination to challenge on protection of broiler chickens against Marek's disease virus challenge. *Australian Veterinary Journal* 85(9):348-355.

## TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI ISOLATI ITALIANI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*: RISULTATI PRELIMINARI

Stefani E., Matucci A., Tondo A., De Grandi G., Dal Pra M., Gastaldelli M., Catania S.

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

### Summary

*Mycoplasma synoviae* (MS) is an important pathogen in intensive poultry industry causing consistent economic losses. MS infection determines airsacculitis and infectious synovitis in chickens and turkeys and is associated to EAA (Eggshell Apex Abnormality) in chicken layers. Control of MS dissemination comprises biosecurity measures, antibiotic treatments and vaccination. Molecular typing techniques represent an important tool to expand the knowledge of MS epidemiology and to investigate the circulating field strains. For many years, MS typing was carried out by sequence analysis of the conserved tract of the variable lipoprotein and hemagglutinating A (*vlhA*) gene (GTS *vlhA*). Although such approach displays sufficient discriminatory power to easily differentiate unrelated strains, it is not adequate to describe genetic relatedness between close strains. Multi-locus sequence typing (MLST) has a greater discriminatory power and is considered a useful tool to infer the clonality and evolutionary relatedness of field strains. In this study, GTS *vlhA* and a MLST scheme based on 7 housekeeping genes (*adhA*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*) were used to describe the genetic profile of MS field strains (123) collected from 2010 to 2020. The GTS *vlhA* method could differentiate the samples into 6 known (B, C, C3-13, D, F, M) and 4 novel types (O, P, Q and R). Differently, MLST distinguished 16 known and 37 new sequence types (ST). *Minimum spanning trees* were constructed to describe the relationship between our samples and others isolated in different countries and previously described and to investigate the relation between ST and time of isolation or host. Interestingly, ST 21 was the one observed with higher frequency over the observational period and showed the broader distribution among the considered countries. Finally, MLST proved a more reliable tool for correctly differentiate vaccinal from field strains. In conclusion, both MS typing methods can be considered valid tools for epidemiologic evaluation and pathogen containment of circulating field strains.

### INTRODUZIONE

*Mycoplasma synoviae* (MS) è un microrganismo considerato patogeno e possibile causa di importanti perdite economiche nell'industria avicola. Può trasmettersi sia per via verticale dai riproduttori alla progenie, che orizzontale tra individui dello stesso allevamento e diversi allevamenti. MS causa sinusite e forme respiratorie principalmente in polli e tacchini, nelle galline ovaiole può anche dare origine all'anormalità dell'apice dell'uovo (EAA) con conseguenti perdite economiche (1). Gli strumenti finalizzati al contenimento della diffusione di MS attualmente a nostra disposizione, risultano essere la biosicurezza, l'invio al macello dei gruppi di animali risultati MS positivi ed infine i trattamenti antibiotici che possono contribuire a mitigare l'impatto dell'infezione sulle performance, ma non possono tuttavia eliminare la possibilità

di diffusione. In particolare, nel campo della biosicurezza risulta fondamentale la conoscenza del patogeno poiché solamente attraverso un'approfondita conoscenza delle vie di trasmissione è possibile trovare sistemi atti a contrastarne la diffusione. Ad esempio, identificare la possibile sorgente dell'infezione e la modalità di diffusione rappresentano una parte integrante nella gestione del sistema finalizzato ad imparare dal passato per prevenire futuri focolai. Sicuramente la diagnosi precoce risulta molto utile per il controllo dei focolai di MS e, associata alla tipizzazione di tipo molecolare, può diventare un valido strumento per differenziare i ceppi di MS circolanti e quindi anche le possibili fonti di diffusione. Nel corso degli ultimi anni, differenti metodiche molecolari sono state messe a punto per poter discriminare i differenti ceppi di MS. Il metodo di più ampio impiego è stato sicuramente quello proposto da Bencina et al., 2001 (2) e successivamente perfezionato da Hammond et al., 2009 (3) che prevede l'analisi GTS (gene targeted sequencing) della regione conservata al 5' del gene *variable lipoprotein and hemagglutinin A* (*vlhA*), presente in singola copia nel genoma di MS. Questo metodo possiede un alto potere discriminatorio ed è sicuramente molto utile per differenziare ceppi non correlati tra loro ma, vista l'elevata pressione selettiva a cui è sottoposto il gene *target* risulta difficile stabilire una correlazione evolutiva tra i ceppi (4). Per questo, recentemente, sono state introdotte nuove metodiche molecolari come le metodiche MLST (Multi-Locus Sequence Typing), MLVA (Multiple-Locus Variable-tandem repeats Analysis) e il Core Genome Multi-Locus Sequence Typing (cgMLST) (4, 5, 6 e 7). Le metodiche MLST basate sull'analisi di geni *housekeeping* rappresentano una risorsa molto utile perché consentono una condivisione dei dati ottenuti. La metodica MLST basata sull'analisi di 7 geni (4) è a tutt'oggi quella che ha avuto una maggior diffusione proprio grazie alla disponibilità di un database pubblico (*PubMLST*) in cui è possibile analizzare le sequenze e condividere in maniera univoca eventuali nuovi profili genetici identificati. I sette geni di interesse (*adhA*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*) vengono amplificati e sequenziati e ogni differente sequenza allelica viene identificata da un numero univoco. La combinazione di questi alleli crea un "sequence type" (ST) numerico che identifica il ceppo MS analizzato. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare ed analizzare, tramite analisi GTS sulla regione conservata del gene *vlhA* (GTS *vlhA*) e MLST con protocollo a 7 geni, i ceppi circolanti nel territorio italiano dal 2010 al 2020 al fine di fornire utili spunti applicativi per la corretta scelta della tipologia di analisi da effettuare e dare quindi una panoramica del contesto italiano.

## MATERIALI E METODI

### *Selezione dei campioni*

Sono stati selezionati 123 ceppi di MS provenienti sia da allevamenti industriali che rurali pervenuti tra il 2010 e il 2020 ed un isolato del ceppo vaccinale MS-H impiegato come controllo. Le specie di derivazione dei campioni sono gallina, pollo, tacchino ed un fenicottero. Tra i campioni scelti sono presenti anche 4 campioni (IZSVE/1231/D13/61, IZSVE/368/D14/2, IZSVE/9684/VR19, IZSVE/5076/VR20) provenienti da allevamenti vaccinati con MS-H. Sono stati estrapolati dal database *PubMLST* (<https://pubmlst.org/msynoviae>) i dati relativi agli ST di 134 campioni provenienti da altri Stati. In particolare: 53 isolati di provenienza USA, 29 dall'Ungheria, 16 dalla Cina, 4 dalla Spagna, 3 dalla Repubblica Ceca, Ucraina, Austria, Russia e Slovenia, 2 da Australia, Canada, Giordania, Libano, Romania e Tunisia, 1 da Argentina, Brasile, Israele, Serbia e Taiwan.

### *Estrazione del DNA*

Il DNA genomico dei ceppi di MS selezionati è stato estratto utilizzando l'estrattore Maxwell 16 System e il kit Maxwell 16 Blood Purification System seguendo le istruzioni suggerite dal produttore.

### *PCR-GTS *vlhA**

I *primer* utilizzati per l'amplificazione della regione conservata al 5' del gene *vlhA* sono descritti in Hammond et. al., 2009 (3), impiegando la GoTaq® DNA Polymerase secondo le istruzioni suggerite dal produttore. Il ciclo di amplificazione prevede un ciclo di attivazione dell'enzima di 95°C per 5', seguito da 36 cicli di amplificazione (95°C per 1', 62°C per 1' e 72°C per 8') e da un ciclo finale di 72°C per 8'.

### *MLST*

Per eseguire l'analisi MLST sono stati amplificati 7 geni housekeeping (*adk*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*) utilizzando le coppie di *primer* descritte da El-Gazzar et al. (4). L'amplificazione è stata eseguita con il kit qPCR Sybr Fast Universal (ditta Merck) utilizzando lo strumento CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System. Il protocollo di amplificazione prevede uno *step* a 95°C per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 1', 54°C per 30" e 72°C per 1,30'.

### *Sequenziamento*

Gli amplificati ottenuti dalla metodica GTS-*vlhA* e MLST sono stati sequenziati su entrambi i filamenti per il gene di interesse impiegando il kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (v. 2.0 Applied Biosystems) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati valutati e analizzati tramite il software BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.6.1 (8). La tipizzazione mediante analisi GTS-*vlhA* è stata effettuata analizzando la lunghezza della regione ricca in proline (PRR) come descritto in Bencina et al., 2001 (2), e la regione in 3' (3). Le sequenze alleliche ottenute sono state codificate utilizzando il *database PubMLST*). La sequenza numerica formata dal tipo di allele identificato in ogni locus corrisponde ad un determinato ST depositato nel database. Le sequenze alleliche e gli ST non presenti nel *PubMLST* sono stati depositati e codificati. La correlazione tra i differenti ceppi è stata evidenziata creando un MST (*minimum spanning tree*) costruito usando l'algoritmo goeBURST full MST (9) in programma PHYLOViZ 2.0 usando la stringa dei 7 alleli identificati in ogni ceppo. Per la definizione di *Clonal complex* abbiamo inserito un *cut-off* di 2 differenze alleliche.

### *Calcolo dell'indice di diversità di Simpson*

L'indice di diversità di Simpson è stato calcolato utilizzando la formula  $D=1-[(n(n-1)/N(N-1))]$  dove n è il numero di campioni per ogni categoria e N è il numero totale di campioni di tutte le categorie.

## **RISULTATI**

Sono stati analizzati 123 campioni italiani con metodica GTS *vlhA* e con metodica MLST pervenuti dal 2010 al 2020 (vedi Tabella 1) e il ceppo vaccinale MS-H. Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi dopo amplificazione e analisi di sequenza del gene *vlhA* e dei 7 geni *housekeeping* utilizzati nella metodica MLST.

**Tabella 1:** Campioni di MS italiani analizzati e riassunto dei risultati ottenuti dopo tipizzazione GTS (vlhA) e MLST (ST).

<i>ID CAMPIONE</i>	<i>vlhA</i>	<i>ST</i>	<i>Specie</i>	<i>Clonal Complex</i>
<b>MS-H</b>	C3 -13	43	-	CC9
<b>IZSVE/2010/5711</b>	C3 -13	131*	Fenicottero	Singleton
<b>IZSVE/6643/D11/1f</b>	P°	105*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/6642/D11/3f</b>	P°	105*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/7106/D11/12</b>	D	127*	Gallina	CC7
<b>IZSVE/1760/D12/4fil aexp</b>	C	10	Pollo	Singleton
<b>IZSVE/5715/D12/4</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/806/D12/14</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1306/D12/24fil</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/1806/D12/15fil</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/70/D12/4fil</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1805/D12/3</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1203/D12/2</b>	F	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/5619/D12/5f</b>	O°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/86/D12/2fil</b>	D	121*	Pollo	CC7
<b>IZSVE/4109/D13/1f</b>	F	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/6455/D13/25f</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/4515/D13/3f</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/2211/D13/1f</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/2094/D13/10</b>	F	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1231/D13/61<sup>#</sup></b>	C3 -13	43	Pollo	CC9
<b>IZSVE/1711/D13/2f</b>	O°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/4663/D13/2f</b>	D	66	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/3757/2d aexp</b>	D	68	Gallina	CC1
<b>IZSVE/4498/D13/2f</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/5914/D13/5d</b>	F	83	Pollo	CC1
<b>IZSVE/5914/D13/1</b>	F	83	Pollo	CC1
<b>IZSVE/4828/D13/1f</b>	M	112*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/4444/D13/23f</b>	D	116*	Gallina	CC7
<b>IZSVE/6681/D13/7f</b>	D	125*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/5524/D13/6f aexp</b>	Q°	135*	Gallina	CC1

<b>IZSVE/4004/D13/3 dil</b>	O°	139*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3441/D14/2d p</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/150/D14/11d</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5575/D14/5F</b>	F	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/589/D14/1</b>	M	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/151/D14/1d pplo</b>	P°	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/368/D14/2#</b>	C3 -13	43	Pollo	CC9
<b>IZSVE/5817/D14/1f</b>	M	60	Pollo	CC1
<b>IZSVE/149/D14/16f aexp</b>	O°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3413/D14/1F</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/4418/D14/6f a</b>	D	106*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/494/D14/17f</b>	D	113*	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1353/D14/1f</b>	D	113*	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/6259/D14/33D</b>	D	113*	Gallina	CC3
<b>IZSVE/6365/D14/2F</b>	F	114*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/6399/D14/1F</b>	F	120*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/590/D14/1f a</b>	D	121*	Pollo	CC7
<b>IZSVE/2974/D14/1f</b>	D	128*	Tacchino	CC7
<b>IZSVE/6709/D14/1f aexp</b>	P	138*	Tacchino	Singleton
<b>IZSVE/5662/D15/2f a</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5665/D15/1f a</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/390/D15/3f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/2705/D15/11f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/740/D15/17 d aexp</b>	F	72	Gallina	CC3
<b>IZSVE/2519/D15/1f aexp</b>	F	72	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/4599/D15/2</b>	D	73	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1684/D15/18f</b>	D	73	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5871/D15/2f a</b>	D	74	Pollo	Singleton
<b>IZSVE/2518/D15/1f aexp</b>	M	84	Gallina	CC1
<b>IZSVE/2376/D15/1f A</b>	D	86	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/3622/D15/2f a</b>	D	86	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/5872/D15/3</b>	B	88	Gallina	CC1
<b>IZSVE/5502/D15/3 f a</b>	F	107*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/5872/D15/3f a</b>	B	108*	Pollo	CC1

<b>IZSVE/3400/D15/1f</b>	D	115*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1687/D15/1f</b>	D	118*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/2775/MAV16/1 f a</b>	F	21	Pollo	CC3
<b>IZSVE/3490/MAV16/25f a</b>	P°	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1074/MAV16/15</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1196/MAV16/1f a</b>	D	71	Pollo	CC1
<b>IZSVE/MAV16/1988/34f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/MAV16/2953/28</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/MAV16/3483/6f</b>	D	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/MAV16/1903/1f</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1925/MAV16/36</b>	F	72	Pollo	CC3
<b>IZSVE/1466/MAV16/ 4</b>	D	74	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/MAV16/3007/1</b>	C	85	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/554/MAV16/1</b>	C3 -13	110*	Pollo	CC8
<b>IZSVE/1722/MAV16/5</b>	C	120*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/MAV16/1973/1f</b>	D	125*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/400/MAV16/12</b>	Q°	132*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/2316/MAV16/1 f a</b>	O°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1807/MAV16/2 F</b>	O°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/754/MAV17/5F</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/1595/MAV17/3fa ref</b>	P°	63	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/470/MAV17/71f a</b>	D	111*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/303/MAV17/23F</b>	D	113*	Pollo	CC3
<b>IZSVE/2005/MAV17/1f</b>	F	114*	Tacchino	Singleton
<b>IZSVE/3681/MAV17/1 II d a</b>	P°	117*	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1594/MAV17/3f a</b>	C	122*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/3301/MAV17</b>	C	123*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3214/MAV17</b>	C	124*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/2395/MAV17/2F</b>	D	129*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/3035/MAV17/1f</b>	F	130*	Pollo	CC1
<b>IZSVE/3304/MAV17/10f a</b>	Q°	132*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/3816/MAV17/5fa</b>	P°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1588/MAV18/3fa</b>	F	71	Gallina	CC1
<b>IZSVE/1027/MAV18/1</b>	F	71	Tacchino	CC1

<b>IZSVE/1034/MAV18/1</b>	D	71	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/1021/MAV18/1</b>	O°	126*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/7241/VR19/1</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/9641/VR19</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/10139/VR19</b>	D	21	Gallina	CC3
<b>IZSVE/9684/VR19#</b>	C3 -13	43	Gallina	CC8
<b>IZSVE/11098/VR19</b>	Q°	60	Gallina	CC1
<b>IZSVE/11373/VR19</b>	D	63	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3377/MAV19</b>	F	72	Gallina	CC3
<b>IZSVE/MAV19/346</b>	D	119*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/115/MAV19/1fa</b>	O°	133*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/10559/VR19</b>	C	136*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/252MAV19/1f</b>	P°	137*	Gallina	Singleton
<b>IZSVE/6702/VR20</b>	D	21	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/5076/VR20#</b>	C3 -13	43	Pollo	CC9
<b>IZSVE/6701/VR20</b>	R°	60	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/6706/VR20</b>	C	88	Tacchino	CC1
<b>IZSVE/6699/VR20</b>	C	122*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/6704/VR20</b>	C	122*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/2347/VR20</b>	F	140*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/370/VR20</b>	C	141*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/3570/VR20</b>	C	141*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/4742/VR20/2</b>	F	142*	Gallina	CC1
<b>IZSVE/6700/VR20/1</b>	C	143*	Tacchino	CC3
<b>IZSVE/6707/VR20/1</b>	O°	144*	Gallina	CC1

Nota:

° nuovi tipi ottenuti dopo analisi di sequenza del gene *vlhA*

\*nuovi ST identificati e depositati nel database

# campione proveniente da allevamenti vaccinati

*Tipizzazione basata sul sequenziamento della regione conservata del gene vlhA*

L'analisi di sequenza della regione conservata del gene *vlhA* differenzia i 123 ceppi MS analizzati in 10 tipi: B, C, C3-13, D, F, M, O, P, Q e R (Tabella 1). Tra questi i tipi O, P, Q e R presentano una lunghezza del PRR di 31, 27, 24, 37 amminoacidi rispettivamente e risultano essere di nuova identificazione. L'indice di diversità di Simpson calcolato sui 123 campioni ha un valore di 0.78. Il tipo più rappresentato nella nostra selezione di campioni è il D (44 campioni) seguito dal tipo F (31 campioni). Il tipo

C3-13 attribuito al ceppo vaccinale MS-H è stato riscontrato in campioni provenienti da animali vaccinati ma in due casi, nel campione IZSVE/2010/5711 già discusso in Catania et al., 2016 (10) e nel campione IZSVE/554/MAV16/1, tale tipo non è associato ad animali vaccinati.

### MLST

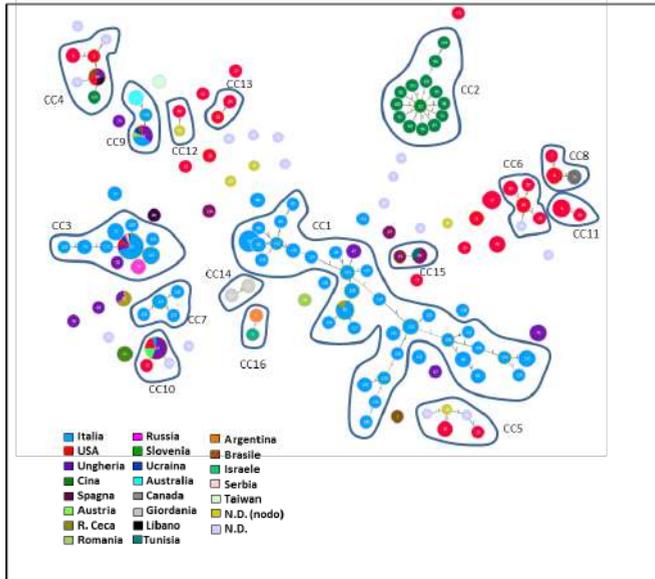
La metodica MLST differenzia i 123 campioni italiani analizzati in 53 ST di cui 37 sono di nuova assegnazione (da ST 105 a 144) (Tabella 1). Tra questi ultimi, alcuni ST derivano da nuove combinazioni alleliche mentre altri presentano nuovi alleli nei geni *adk* (30-31-32-33), *gmk* (28), *nagC* (54-55-57-58), *ppa* (25) e *recA* (34-35-36-37). Tutte le nuove combinazioni e i nuovi alleli sequenziati sono stati depositati nel database *PubMLST*. L'indice di diversità di Simpson ha un valore di 0.93. Per evidenziare la correlazione che sussiste tra i campioni italiani analizzati e il contesto mondiale sono stati estrapolati dal database *PubMLST* i dati relativi a ST di 134 campioni provenienti da 20 Stati. La relazione che si instaura tra i vari ST si può apprezzare nel *minimum spanning tree* (MST) di Figura 1. Abbiamo ottenuto 16 Clonal Complex (CC) e 44 singleton (ST non raggruppabili per similarità allelica). I 123 ceppi italiani analizzati si distribuiscono nei CC: 1, 3, 7, 9 e 10 e in quattro singleton. I 53 ceppi USA si distribuiscono in 9 CC e 10 singleton e condividono ST 10 e ST 21 con i ceppi Italiani. ST 21 risulta essere la combinazione allelica più condivisa tra i vari Stati analizzati e infatti lo ritroviamo in ben 8 differenti Paesi (Italia, USA, Ungheria, Ucraina, Serbia, Austria, Russia e Tunisia). Per gli altri Paesi sono presenti nel database un numero limitato di isolati tipizzati, per cui risulta difficile fare delle considerazioni solide.

L'evoluzione temporale dei ceppi Italiani dal 2010 al 2020 si può apprezzare nel grafico MST di Figura 2. Come si può notare, gli ST 21, ST 71 e ST 63 vengono isolati in quasi tutti gli anni analizzati e sono numericamente rappresentativi della maggior parte dei ceppi analizzati (Tabella 1). Gli altri ST sono meno rappresentati.

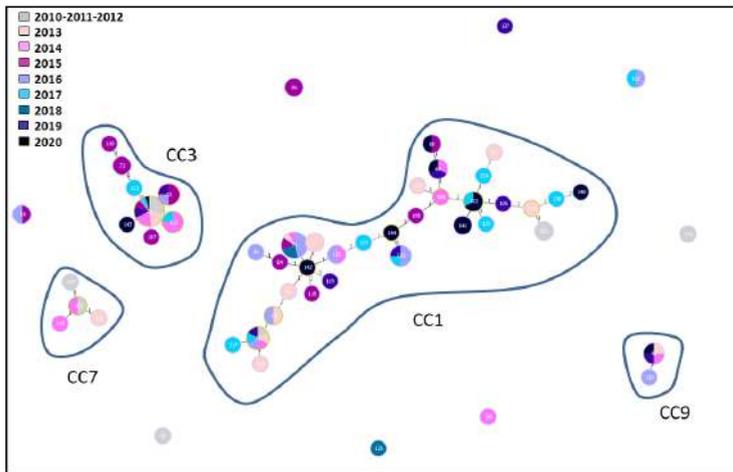
La metodica MLST, avendo un *Simpson Index* più alto, riesce a differenziare i ceppi analizzati in molti più ST rispetto ai tipi derivanti dall'analisi GTS *vlhA* (53 ST contro 10 tipi). E' interessante notare comunque, come già riportato per *Mycoplasma gallisepticum* (11), che a un medesimo genotipo GTS possono essere associati differenti ST e viceversa. Infatti negli ST 21, ST 71, ST 120, ST 133, ST 60 e ST 88 troviamo differenti tipi GTS *vlhA*, e, ad esempio, a campioni con tipo D sono stati assegnati diversi ST.

Tutti i campioni provenienti da allevamenti in cui era stata effettuata la vaccinazione per MS analizzati in questo studio presentano ST 43 e appartengono al CC9 come l'isolato di riferimento MS-H, inoltre è interessante notare che il GTS *vlhA* risulta essere C3-13 dato peraltro già noto (Tabella 1). Di particolare interesse, invece, risultano essere i due isolati IZSVE/2010/5711 e IZSVE/554/MAV16/1, la metodica GTS *vlhA* li classifica come C3-13 mentre l'analisi MLST assegna ai due campioni ST 131 ed ST 110.

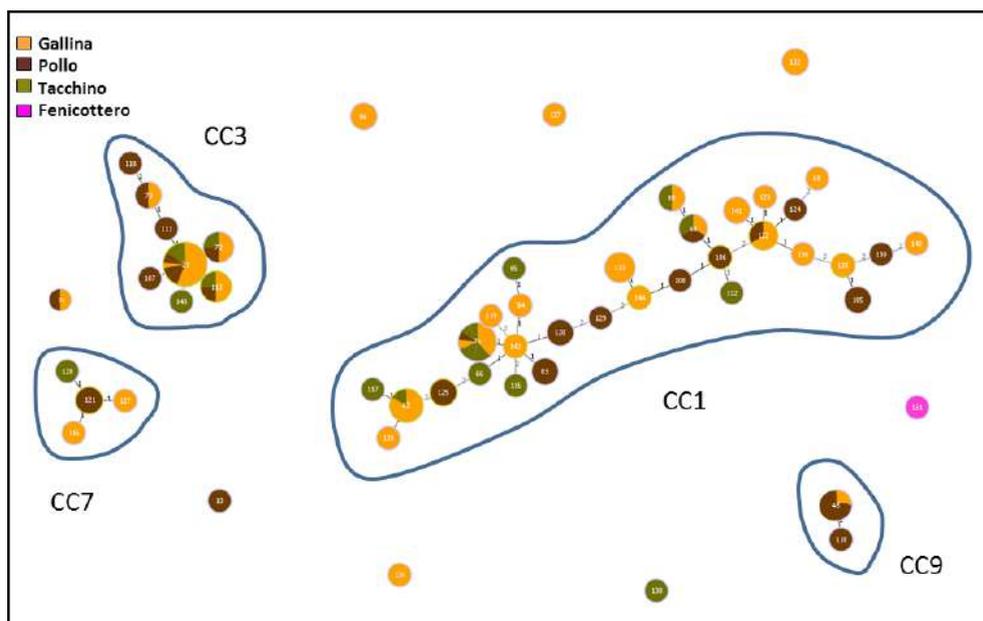
In figura 3, si può apprezzare la distribuzione degli ST rispetto alla specie.



**Figura 1:** MST dei campioni italiani nel contesto mondiale. Il numero scritto all'interno dei cerchi rappresenta il valore ST. Il numero presente nelle linee che collegano i vari ST rappresenta la distanza allelica. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei campioni che appartengono a quel ST. Il colore dei cerchi indica Lo Stato di appartenenza.



**Figura 2:** MST dei campioni italiani in cui vengono evidenziati gli anni di isolamento. Il numero scritto all'interno dei cerchi rappresenta il valore ST. Il numero presente nelle linee che collegano i vari ST rappresenta la distanza allelica. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei campioni che appartengono a quel ST. Il colore dei cerchi indica l'anno di isolamento del ceppo MS analizzato.



**Figura 3:** MST dei campioni italiani in cui vengono evidenziati le specie di appartenenza. Il numero scritto all'interno dei cerchi rappresenta il valore ST. Il numero presente nelle linee che collegano i vari ST rappresenta la distanza allelica. La grandezza dei cerchi è proporzionale al numero dei campioni che appartengono a quel ST. Il colore dei cerchi la specie aviaria di provenienza dei ceppi.

## DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo tipizzato con le due metodiche GTS *vlhA* e MLST un totale di 123 ceppi di MS conferiti nel decennio 2010- 2020 per comprendere le specificità dei ceppi circolati nel territorio e rendere facilmente trasferibile il potenziale utilizzo delle metodiche. Una metodica di tipizzazione molecolare riproducibile e con un buon potere discriminatorio può contribuire ad espandere la conoscenza nell'epidemiologia di MS ed essere un valido strumento per implementare i piani di controllo ed eradicazione del patogeno. Il metodo di tipizzazione GTS *vlhA* ha un alto potere discriminatorio (indice di Simpson = 0.78) e riesce a differenziare i 123 ceppi Italiani analizzati in 10 tipi secondo classificazione di Bencina et al.,2001 (2). Di questi, 4 risultano di nuova identificazione, confermando che le proteine di superficie subiscono una maggiore pressione selettiva (11) e possono dare origine a nuovi tipi. Come già visto in precedenza (10) la metodica GTS *vlhA* in certi casi, non è in grado di distinguere il ceppo di campo dal ceppo vaccinale. Nel nostro studio infatti sono due i campioni di campo che potrebbero essere erroneamente classificati identici al ceppo vaccinale (tipo C3-13) senza esserlo realmente (IZSVE/2010/5711 e IZSVE/554/MAV16/1) (Tabella 1). Il metodo di tipizzazione MLST a "7 geni" (3) ha un potere discriminatorio più alto rispetto al GTS *vlhA* (Indice Simpson 0.93) e

riesce infatti a differenziare i 123 ceppi italiani in 53 ST. Inoltre il metodo MLST sembra in grado di distinguere i ceppi vaccinali (MS-H) da quelli di campo in maniera univoca. Tutti gli isolati provenienti da allevamenti vaccinati con MS-H di questo studio ricadono nel ST 43 come il ceppo vaccinale, mentre i due campioni IZSVE/2010/5711 e IZSVE/554/MAV16/1 risultano essere classificati come ST 131 e ST 110 rispettivamente (Tabella 1) e quindi non possono essere considerati identici al ceppo del vaccino in questione. Al ceppo vaccinale MS-live, invece, è stato assegnato l'ST 44 che, ad oggi, non è stato riscontrato nei campioni italiani analizzati. Sono stati pubblicati altri metodi di tipizzazione MLST per MS (5) ma, per il momento, solo il metodo MLST basato sull'analisi di 7 geni (4) è disponibile nel database pubblico *PubMLST*. La presenza di un database consente non solo di consultare, ma anche di depositare e condividere nuove combinazioni alleliche e nuovi alleli che hanno dato origine a nuovi ST classificando gli isolati in modo univoco e uguale per tutti. Il database *PubMLST* consente anche di confrontare i nostri dati con quelli degli isolati provenienti da altri Stati (Figura 1). Tutti i ceppi disponibili ad oggi su *PubMLST* vengono differenziati in 144 ST differenti che sono raggruppabili in 16 CC e 44 singleton. Gli stati numericamente più rappresentati sono Italia (123 ceppi), USA (54 ceppi), Ungheria (26 ceppi) e Cina (16 ceppi). È interessante notare che il CC1, il più numeroso, contiene solo isolati di origine Europea e il CC2 solo ceppi di origine Cinese, suggerendo con le dovute cautele l'origine ancestrale non comune tra i ceppi rinvenuti nei due CC. Di particolare interesse è sicuramente l'ST 21. Questa combinazione allelica viene attualmente condivisa da ben 8 Stati: Italia, USA, Ungheria, Ucraina, Serbia, Austria, Russia e Tunisia, è l'ST quantitativamente più presente nei ceppi italiani oggetto di questo studio (Tabella 1) e si ritrova in quasi tutti gli anni (Figura 2) a suggerire che sia un ceppo MS estremamente adattato al territorio. Inoltre ST 21 insieme a ST 71, ST 120, ST 133, ST 60 e ST 88, è una di quelle combinazioni alleliche in cui l'analisi GTS *vlhA* riesce a individuare diversi tipi. Questa osservazione suggerisce che l'analisi dei ceppi MS dovrebbe essere effettuata utilizzando metodiche di tipizzazione il più possibile adatte al quesito diagnostico, e lo studio epidemiologico potrebbe o dovrebbe essere effettuato utilizzando entrambe le metodiche di tipizzazione (4). In tal senso l'analisi MLST potrebbe essere utilizzata per posizionare il ceppo isolato all'interno della popolazione, mentre l'analisi GTS *vlhA* potrebbe differenziare ulteriormente la popolazione clonale (4) oppure trovare un sistema misto come proposto da Clavijo et al., 2019 (13) per *Mycoplasma Hyorhinis*.

Infine, dai dati in nostro possesso non si evidenziano specifiche relazioni tra ST e specie o indirizzo produttivo (Figura 3). Gli ST ritrovati in un numero maggiore di ceppi MS come il 21, 63 e 71 sono stati isolati sia da galline, polli che tacchini.

## CONCLUSIONE

In conclusione le due metodiche di tipizzazione di MS valutate in questo studio si rivelano validi strumenti per una valutazione epidemiologica dei ceppi circolanti nel nostro territorio. Una costante analisi dei dati di tipizzazione nel tempo potrà divenire un valido supporto per meglio comprendere ed interpretare le eventuali correlazione tra i differenti focolai e quindi aiutarci a meglio costruire i sistemi o le strategie di contenimento della diffusione del patogeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Catania, S., Bilato, D., Gobbo, F., Granato, A., Terregino, C., Iob, L., and Nicholas, R. A. (2010). Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian diseases*, 54(2), 961-964.
2. Benčina, D., Drobnič-Valič, M., Horvat, S., Narat, M., Kleven, S. H., and Dovč, P. (2001). Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS microbiology letters*, 203(1), 115-123.
3. Hammond, P. P., Ramírez, A. S., Morrow, C. J., and Bradbury, J. M. (2009). Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Veterinary microbiology*, 136(1-2), 61-68.
4. El-Gazzar, M., Ghanem, M., McDonald, K., Ferguson-Noel, N., Raviv, Z., and Slemmons, R. D. (2017). Development of multilocus sequence typing (MLST) for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 61(1), 25-32.
5. Dijkman, R., Feberwee, A., and Landman, W. J. (2016). Development and evaluation of a multi-locus sequence typing scheme for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathology*, 45(4), 426-442.
6. Kreizinger, Z., Sulyok, K. M., Bekő, K., Kovács, Á. B., Gróznér, D., Felde, O., Marton S, Bányai K., Catania S., Bencina D. and Gyuranecz, M. (2018). Genotyping *Mycoplasma synoviae*: Development of a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis and comparison with current molecular typing methods. *Veterinary microbiology*, 226, 41-49.
7. Ghanem, M., and El-Gazzar, M. (2018). Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. *Veterinary microbiology*, 218, 84-89.
8. 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.
9. Francisco, Alexandre P., et al. "Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach." *BMC bioinformatics* 10.1 (2009): 152.
10. Catania, S., Gobbo, F., Ramirez, A. S., Guadagnini, D., Baldasso, E., Moronato, M. L., and Nicholas, R. A. (2016). Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC veterinary research*, 12(1), 1-7.
11. Matucci A., Stefani E., Tondo A., Dal Pra M., Quaranta E., Paladino A., Bekò K., Gyuranecz M. and Catania S. Genotipizzazione di *Mycoplasma gallisepticum* tramite metodica MLST: risultati preliminari su campioni da IZSVe. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviare* 2019 pag 149-157.
12. Cooper JE and Feil EJ. Multilocus sequence typing—what is resolved? *Trends Microbiol.* 2004;12(8): 373–377.
13. Clavijo, M. J., Sreevatsan, S., Johnson, T. J., and Rovira, A. (2019). Molecular epidemiology of *Mycoplasma hyorhinis* porcine field isolates in the United States. *PloS one*, 14(10).

## **DIAGNOSI MOLECOLARE DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE: COME LA SCELTA DEL PROTOCOLLO E LA CONCENTRAZIONE VI-RALE POSSONO INFLUENZARE L'IDENTIFICAZIONE E LA CARATTE-RIZZAZIONE DEL VIRUS IN PRESENZA DI COINFEZIONI**

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Fortin A.<sup>2</sup>, Valastro V.<sup>2</sup>, Terregino C.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro PD, Italia.*

### **Summary**

Although a great effort has been made to achieve a consistent infectious bronchitis virus (IBV) classification scheme based on the complete S1 gene, economic and time constraints in diagnostic routine often lead to sequence partial S1 regions for IBV genetic characterization. In this context, Sanger sequencing remains the most common and cost-effective option, even if partial results are likely obtained by analyzing samples where multiple field and vaccine strain populations coexist. In the present study, three commonly used RT-PCR methods targeting two regions of the S1 gene were evaluated and compared on 30 specimens tested in triplicate. In detail, test samples were prepared by artificially mixing two vaccine strains, combined at different concentrations and selected among four different IBV *lineages*, i.e. GI-1 (Mass), GI-13 (793/B), GI-19 (QX), GI-23 (Israeli Variant 2). The main goal was to investigate the possible bias in IBV detection and characterization due to the RT-PCR method adopted, the different strains as well as their ratio in the test sample.

Sequence analysis revealed that the three assays yielded consistent results for the majority of the tested samples. When discrepancies occurred, these were likely caused by primer affinity and target amount. Overall, these results confirm the complexity of IBV strain identification process and highlight the importance of a critical evaluation of the obtained results and frequent update the available diagnostic assays for a reliable detection of all the circulating IBV strains. Furthermore, a panel of different molecular assays enabling the simultaneous identification of the multiple IBV strains is recommended to achieve a complete picture of the coexisting strains.

### **INTRODUZIONE**

La Bronchite Infettiva è una delle patologie più comuni nell'ambito della produzione avicola, con un forte impatto economico sull'allevamento ascrivibile alle minori performance produttive, alle misure di profilassi e contenimento, ma anche ai costi di monitoraggio e diagnosi. La complessità nella gestione di questa malattia è determinata principalmente dalla notevole variabilità genetica dell'agente eziologico, il virus della Bronchite infettiva (IBV), che ha dato origine alla comparsa di numerose varianti (Valastro et al., 2016). Queste caratteristiche rendono spesso necessario lo sviluppo di approcci diagnostici alternativi e di strategie vac-

ciali adattate alla situazione epidemiologica locale e talvolta alla singola azienda. Fin dalla comparsa di questo virus, la ricerca di protocolli vaccinali efficaci è stata incessante. Numerosi studi condotti per valutare la cross-protezione tra ceppi hanno portato all'individuazione di alcune combinazioni di varianti vaccinali in grado di garantire un ampio livello di protezione nei confronti di un buon numero di ceppi comunemente circolanti (Cook et al., 1999). Vero è che la comparsa di una nuova variante spesso comporta la revisione del protocollo vaccinale, al fine di assicurare un'adeguata risposta immunitaria degli animali.

Il protocollo vaccinale che di consueto viene adottato è basato sulla somministrazione simultanea di almeno due vaccini vivi attenuati, di cui uno generalmente è rappresentato da un ceppo GI-I (Mass) e l'altro da uno di tipo GI-13 (793B) (Cook et al., 1999; Awad et al., 2016; Terregino et al., 2008), oppure derivato da ceppi indigeni circolanti sul territorio in modo da introdurre nella vaccinazione una componente omologa. In particolare in Italia, dove la circolazione del *lineage* GI-19 (QX) è predominante e fortemente penalizzante, la combinazione di vaccini Mass e QX risulta largamente utilizzata (Franzo et al., 2017; Franzo et al., 2020).

In questo contesto si rivela quindi indispensabile considerare il piano di vaccinazione nell'interpretazione dei dati epidemiologici e dell'esito degli approfondimenti diagnostici. È stato infatti dimostrato che ceppi vaccinali in replicazione possono essere identificati ad alti titoli anche in fasi avanzate del ciclo produttivo (Tucciarone et al., 2018) e che la persistenza a livello locale di alcuni genotipi può essere causata dalla vaccinazione (Franzo et al., 2014). Inoltre, anche in presenza di condizioni epidemiologiche simili, uniformare i programmi vaccinali sul territorio rimane complicato (Legnardi et al., 2019). Questi elementi, insieme alla circolazione di ceppi di campo, rendono pressoché inevitabile la contemporanea presenza di più varianti nello stesso animale o allevamento e complicano la diagnosi, specialmente quando questa è eseguita su pool di campioni ottenuti da soggetti diversi.

Allo scopo di poter individuare il maggior numero di ceppi presenti in un campione diagnostico, numerosi laboratori adottano un panel di metodiche real time RT-PCR specifiche per i diversi *lineage*. Questo approccio però raramente è in grado di discriminare l'origine vaccinale o di campo del *lineage* rilevato, rendendo talvolta necessario il ricorso a metodiche di RT-PCR classiche seguite da sequenziamento nel tentativo di ottenere una più fine caratterizzazione. L'approccio diagnostico resta comunque eterogeneo, sia nell'algoritmo procedurale sia nelle metodiche adottate (Monne, 2016). Partendo dalle criticità sopra descritte, il presente studio compara tre delle metodiche di RT-PCR più comunemente usate, allo scopo di valutare differenze nell'*outcome* diagnostico dopo sequenziamento di campioni creati *ah hoc* per mimare il frequente scenario di "coinfezione" di un campione diagnostico.

## **MATERIALI E METODI**

Per assicurare la presenza di un solo ceppo all'interno del campione, sono stati scelti quattro vaccini comunemente usati dei *lineage* GI-I (Ma5), GI-13 (4/91), GI-19 (QX) e GI-23 (Israeli Variant 2). I vaccini sono stati ricostituiti in 5 ml di PBS e l'RNA è stato estratto con il kit High Pure Viral RNA Kit (Roche). L'RNA di ogni ceppo è stato quindi diluito serialmente e le diluizioni ottenute sono state testate

con una metodica real time RT-PCR in grado di amplificare la regione conservata UTR (Callison et al., 2006). Per ottenere campioni omogenei, i vaccini sono stati diluiti fino ad una concentrazione rilevata in real time RT-PCR pari a circa 18 Ct, considerata come concentrazione tal quale (tq) nel presente studio. Oltre a questa, sono state utilizzate le diluizioni 1:100 (-2) e 1:10000 (-4) dei tal quali. Dalla combinazione di genotipi e concentrazioni sono stati ottenuti 30 campioni (Tabella 2) che sono stati amplificati in triplicato con tre differenti metodiche (Tabella 1).

Gli amplificati ottenuti sono stati visivamente valutati dopo elettroforesi capillare e sequenziati con metodo Sanger utilizzando i primer delle rispettive metodiche. I cromatogrammi sono stati analizzati qualitativamente e le regioni iniziali e terminali in corrispondenza dell'incorporazione dei primer sono state rimosse. Le sequenze nucleotidiche ottenute in *forward* e *reverse* sono state riportate in formato FASTA mediante il software FinchTV (Geospiza, Inc.) e archiviate in un file dedicato per ogni *run* e metodica al fine di valutarne la concordanza. Le sequenze consenso sono state generate e controllate con il software ChromasPro 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd). I nucleotidi classificati come dubbi dal software sono stati manualmente corretti dall'operatore, quando la qualità del cromatogramma lo permetteva. Le sequenze nucleotidiche dei consensi così ottenute sono state riportate in formato FASTA in file dedicati.

L'allineamento preliminare delle sequenze è stato effettuato entro *run* ed entro metodica tramite MAFFT version 7 (Rozewicki et al., 2019) inserendo le 4 sequenze di riferimento dei *lineage* utilizzati (KU736747 (GI-I), AF093793 (GI-13), DQ674739 (GI-19), HM131453 (GI-23)). Il software MEGAX (Kumar et al., 2018) è stato utilizzato per l'analisi filogenetica condotta con metodo Maximum Likelihood (ML).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

A seguito dell'amplificazione dei campioni con le tre metodiche nelle tre *run* indipendenti, tutti i campioni sono risultati positivi, tranne il campione 1 nella *run* 2 con la metodica C (Valastro et al. 2010) anche se molti di questi sono risultati non sequenziabili (Tabella 3). Inoltre, in alcune *run* non è stato possibile ottenere entrambe le sequenze *forward* e *reverse*, ma solo una delle due (Tabella 4).

Una ripetibilità sub-ottimale è emersa nella capacità di ottenere una sequenza di qualità adeguata. I campioni più critici sono stati quelli con una minore concentrazione di RNA target, o quelli ottenuti combinando i 2 vaccini a concentrazione simile. In realtà, anche a basse concentrazioni non si sono evidenziati particolari limiti di sensibilità delle metodiche, le cui performance risultano elevate.

La coesistenza nei campioni di due diverse popolazioni virali ha inciso piuttosto sul sequenziamento. In alcuni casi, gli elettroferogrammi presentavano infatti doppi picchi e un forte segnale di background che rendeva non chiara la determinazione e l'interpretazione della sequenza nucleotidica. In questi casi, l'ispezione delle sequenze in fase di assemblaggio del consenso e la procedura di conferma dei nucleotidi in posizioni dubbie sono azioni operatore-dipendenti che possono influenzare il risultato e determinare, per quanto in cieco, la prevalenza di una sequenza di migliore qualità sull'altra.

Una buona ripetibilità è stata invece dimostrata comparando le *run* di ogni metodica. Solo con la metodica A (Cavanagh et al., 1999) si è ottenuta una classificazione

discordante tra le sequenze *forward* e *reverse* di un campione (n. 5), probabilmente a causa di una diversa affinità dei primer per i due target presenti nel campione.

Le tre metodiche hanno mostrato qualche differenza nella capacità di identificare i ceppi presenti nei campioni. I risultati ottenuti con la metodica A sembrano essere influenzati prevalentemente dalla quantità di target e restituiscono primariamente la sequenza del ceppo presente a maggior concentrazione. La metodica B (Worthington et al., 2008) ha invece mostrato di essere ceppo-dipendente. La natura “*nested*” di questa RT-PCR accentua la maggiore affinità dei primer di questa metodica per i ceppi 4/91 e Mass rispetto a Israeli Variant 2 e soprattutto QX e restituisce output di sequenze migliori sia a livello quantitativo sia qualitativo (Tabella 4).

Il *lineage* QX, seguito da 4/91, è stato identificato nel maggior numero di campioni dalla metodica C (Valastro et al., 2010). Questo test sembra risentire più degli altri della presenza di ceppi multipli. Infatti, delle tre metodiche è quella che con maggior frequenza (Tabella 4), in presenza di concentrazioni analoghe di due *lineage*, non ha permesso l’ottenimento di sequenze di qualità adeguata.

I risultati qui riportati, per quanto preliminari e da approfondire con valutazioni statistiche, mostrano ancora una volta la complessità della diagnosi dell’IBV. Ogni metodica risponde ad esigenze diagnostiche o di ricerca particolari, che possono condizionarne l’inclusività e renderla più o meno specifica. Il disegno dei primer, la variabilità della regione target, la disponibilità in banche dati delle sequenze dei ceppi di interesse, sono solo alcuni degli elementi che possono influenzare la natura stessa di una metodica e la sua efficienza nell’identificare un ceppo piuttosto che un altro.

Inoltre, la riproduzione artificiale di una coinfezione ha sicuramente esacerbato le difficoltà di identificazione. Raramente in condizioni di campo vengono raccolti campioni che contengono concentrazioni simili, perciò il rilievo di doppi picchi o di background nei cromatogrammi è stato probabilmente sovrastimato in questo studio. Al contrario, in condizioni di campo, risulta più frequente l’impossibilità di amplificazione o sequenziamento causata dalla scarsa concentrazione virale o dalla degradazione dell’RNA. Nel caso poi di un’infezione attiva, si può realisticamente presumere che il ceppo di campo raggiunga titoli superiori a quelli di un vaccino eventualmente persistente. Il problema diagnostico insorge piuttosto nelle fasi precoci o tardive di infezione, in cui i titoli virali negli animali possono essere ancora bassi.

La complessità della Bronchite Infettiva non si limita quindi solo agli aspetti clinici, epidemiologici o di controllo. La componente diagnostica è altrettanto coinvolta. Per tale ragione, le informazioni correlate al campione clinico, come l’anamnesi clinica e vaccinale, dovrebbero essere fornite e considerate per la scelta dell’algoritmo diagnostico più idoneo e/o per l’eventuale ricorso ad ulteriori approfondimenti diagnostici per confermare risultati dubbi o inattesi.

**Tabella 1:** dettagli dei metodi utilizzati.

Metodo	RT-PCR	Forward primer	Reverse primer	Riferimento bibliografico
A	One Step RT-PCR	XCE1+	XCE2-	Cavanagh et al., 1999
B	Two Step nested RT-PCR	SX1+ SX3+	SX2- SX4-	Worthington et al., 2008
C	One Step RT-PCR	IBV260+	IBV548-	Valastro et al., 2010

**Tabella 2:** composizione dei campioni (Var2: Israeli variant 2).

Campione	Combinazione		Diluizione		Campione	Combinazione		Diluizione	
	Ceppo 1	Ceppo 2	Ceppo 1	Ceppo 2		Ceppo 1	Ceppo 2	Ceppo 1	Ceppo 2
1	Ma5	4/91	tq	-4	16	QX	Var2	tq	-4
2	Ma5	4/91	-2	-2	17	QX	Var2	-2	-2
3	Ma5	4/91	-4	tq	18	QX	Var2	-4	tq
4	Ma5	4/91	tq	tq	19	QX	Var2	tq	tq
5	Ma5	4/91	-4	-4	20	QX	Var2	-4	-4
6	Ma5	QX	tq	-4	21	QX	4/91	tq	-4
7	Ma5	QX	-2	-2	22	QX	4/91	-2	-2
8	Ma5	QX	-4	tq	23	QX	4/91	-4	tq
9	Ma5	QX	tq	tq	24	QX	4/91	tq	tq
10	Ma5	QX	-4	-4	25	QX	4/91	-4	-4
11	Ma5	Var2	tq	-4	26	Var2	4/91	tq	-4
12	Ma5	Var2	-2	-2	27	Var2	4/91	-2	-2
13	Ma5	Var2	-4	tq	28	Var2	4/91	-4	tq
14	Ma5	Var2	tq	tq	29	Var2	4/91	tq	tq
15	Ma5	Var2	-4	-4	30	Var2	4/91	-4	-4

**Tabella 3:** Numero di campioni non sequenziabili per metodica.

Metodo	Run 1	Run 2	Run 3	Totale	Riferimento bibliografico
A	6	2	6	14	Cavanagh et al., 1999
B	3	6	3	12	Worthington et al., 2008
C	6	7	4	17	Valastro et al., 2010

**Tabella 4:** risultati ottenuti con le tre metodiche nelle tre *run* indipendenti. In rosso il campione negativo; in verde i risultati discordanti entro run; in blu i risultati discordanti tra metodiche (\* presenza di mismatches rispetto alla sequenza di riferimento; n.s.: campione non sequenziabile; Interm.: sequenza intermedia tra 4/91 e Mass.; Var2: Israeli variant 2).

ID	Combinazione	Divisione	A(XCE1+XCE2)			B(SX3+SX4)			C(HB26+HB58)																	
			F	R	Consenso	F	R	Consenso	F	R	Consenso															
1	Mas-091	tg-4	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas											
2		-2-2	491	491	491	491	491*	491	491	491	491	491*	491	491	n.s.											
3		-4/4	491	491	491	491	491*	491	491	491	491*	491	491	491	491											
4		tg/4	491	491	491	491	491*	491	491	491	491*	491	491	491	491											
5		-4-4	n.s.	n.s.	n.s.	491	Mas	Interm.	491	491	491	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.											
6	Mas-OX	Tg-4	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas											
7		-2-2	Mas	Mas	Mas	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*											
8		-4/4	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX											
9		tg/4	n.s.	n.s.	n.s.	Mas	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*	Mas*											
10		-4-4	Mas	Mas	Mas	n.s.	n.s.	n.s.	Mas	Mas	Mas	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.											
11	Mas-Var2	tg-4	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas											
12		-2-2	n.s.	n.s.	n.s.	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas											
13		-4/4	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2											
14		tg/4	Var2	Var2	Var2	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*											
15		-4-4	Var2	n.s.	n.s.	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas	Mas											
16	OX-Var2	tg-4	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX											
17		-2-2	n.s.	n.s.	n.s.	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2											
18		-4/4	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2											
19		tg/4	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*	Var2*											
20		-4-4	OX	OX	OX	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	n.s.	n.s.	OX	OX											
21	OX-491	tg-4	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX	OX											
22		-2-2	491*	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491											
23		-4/4	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491											
24		tg/4	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491											
25		-4-4	n.s.	n.s.	n.s.	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491											
26	Var2-491	tg-4	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2	Var2											
27		-2-2	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491											
28		-4/4	n.s.	n.s.	n.s.	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491											
29		tg/4	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491	491											
30		-4-4	491*	491	491	n.s.	n.s.	n.s.	491	491	491	491*	491*	491*	491*											
Totale sequenze caratterizzate			23	22	21	27	27	26	34	23	24	24	27	24	25	26	25	26	25	25	22	20	18	18	24	22

## BIBLIOGRAFIA

1. Awad, F., Hutton, S., Forrester, A., Baylis, M., & Ganapathy, K. (2016). Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathology*, *45*(2), 169-177.
2. Bru, T., Vila, R., Cabana, M., & Geerligs, H. J. (2017). Protection of chickens vaccinated with combinations of commercial live infectious bronchitis vaccines containing Massachusetts, Dutch and QX-like serotypes against challenge with virulent infectious bronchitis viruses 793B and IS/1494/06 Israel variant 2. *Avian pathology*, *46*(1), 52-58.
3. Callison, S. A., Hilt, D. A., Boynton, T. O., Sample, B. F., Robison, R., Swayne, D. E., & Jackwood, M. W. (2006). Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of virological methods*, *138*(1-2), 60-65.
4. Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., & Naylor, C. J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, *28*(6), 593-605.
5. Cook, J. K., Orbell, S. J., Woods, M. A., & Huggins, M. B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology*, *28*(5), 477-485.
6. Franzo, G., Naylor, C. J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., ... & Cecchinato, M. (2014). Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine*, *32*(50), 6765-6767.
7. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Blanco, A., Nofrarías, M., Biarnés, M., Cortey, M., ... & Cecchinato, M. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine*, *34*(46), 5670-5676.
8. Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C. M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., ... & 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), e0184401.
9. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Moreno, A., Legnardi, M., Massi, P., Tosi, G., ... & Gavazzi, L. (2020). Phylodynamic analysis and evaluation of the balance between anthropic and environmental factors affecting IBV spreading among Italian poultry farms. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-11.
10. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, *35*(6), 1547-1549.
11. Legnardi, M., Franzo, G., Koutoulis, K. C., Wiśniewski, M., Catelli, E., Tucciarone, C. M., & Cecchinato, M. (2019). Vaccine or field strains: the jigsaw pattern of infectious bronchitis virus molecular epidemiology in Poland. *Poultry science*, *98*(12), 6388-6392.
12. Monne, I. (2016). Stability and diversity: the Yin and Yang of gammacoronaviruses genome. Proc. 9<sup>th</sup> International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Leusden, The Netherlands, 21-24 June 2016.

13. Rozewicki, J., Li, S., Amada, K. M., Standley, D. M., & Katoh, K. (2019). MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic acids research*, 47(W1), W5-W10.
14. Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., ... & Capua, I. (2008). Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathology*, 37(5), 487-493.
15. Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., ... & 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. *Poultry science*, 97(1), 303-312.
16. Valastro, V., Monne, I., Fasolato, M., Cecchettin, K., Parker, D., Terregino, C., & Cattoli, G. (2010). QX-type infectious bronchitis virus in commercial flocks in the UK. *Veterinary Record*, 167(22), 865-866.
17. Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349-364.
18. Worthington, K. J., Currie, R. J. W., & Jones, R. C. (2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*, 37(3), 247-257.

## **INDICE DEGLI AUTORI**



## A

Allée C. 151

## B

Bacchin C. 45  
Bacenetti J. 21  
Bano L. 45, 87, 127  
Barbieri I. 119  
Baschieri S. 79  
Berto G. 119  
Boldini S. 189  
Bonfante F. 67, 79  
Bongiorno V. 53  
Bonvegna M. 61  
Borrelli L. 183  
Bortolami A. 67, 79  
Bottinelli M. 83  
Branciarri R. 157  
Brown P.A. 151  
Burnside T. 35

## C

Cagnardi P. 137  
Carraro L. 127, 137  
Casagrande-Proietti P. 157  
Castellina C. 53  
Catania S. 45, 83, 87, 193  
Catelli E. 109  
Cecchinato M. 109, 151, 205  
Ceruti R. 45  
Cornaggia M. 45, 87  
Costantini M. 21

## D

Dal Pra M. 193  
De Grandi G. 83, 193  
Dellepiane L. 61  
Di Castri A. 45, 87  
Di Cesare F. 137  
D'Incau M. 169

Dipineto L. 183  
Donini M. 79  
Drigo I. 45, 127  
Drissi Touzani C. 79

## E

El Houadfi M. 79

## F

Felici M. 97  
Ferrazzi V. 53  
Ferro T. 45  
Fincato A. 83  
Fiorentini L. 97, 119, 169  
Fioretti A. 183  
Fortin A. 205  
Franch R. 127  
Franciosini M.P. 157  
Franzo G. 109, 151, 169, 205

## G

Gambi L. 119, 169  
Garuti M. 29  
Gastaldelli M. 193  
Ghiselli F. 97  
Giovanardi D. 45  
Gobbo F. 87  
Grilli E. 97  
Grilli G. 53, 137  
Guolo A. 45

## K

Koutoulis K. 119

## L

Laconi A. 127, 137  
Legnardi M. 109, 151, 205

Lico C. 79  
Losasso C. 87  
Lupini C. 109

## M

Mannelli A. 61  
Marenzoni M.L. 157  
Marusic C. 79  
Massi P. 97, 119  
Matucci A. 193  
Mazzacan E. 79  
Mazzetto E. 67  
Menandro M.L. 169  
Menchetti M. 157  
Menna L.F. 183  
Merenda M. 83  
Mescolini G. 109  
Minichino A. 183  
Moschioni C. 45  
Musa L. 157

## N

Nebbia P. 61

## O

Opengart K. 37  
Orsini M. 87

## P

Pace A. 183  
Palmieri N. 127  
Panzarin V. 67  
Paola M. 169  
Peruzzo A. 87  
Picchi M. 83  
Piccinini S. 29  
Piccirillo A. 127, 137  
Piovano F. 61  
Piva A. 97  
Pompameo M. 183

## Q

Quaglia G. 109

## R

Rage E. 79  
Ranucci D. 157  
Rizzardi A. 45  
Rossi I. 83  
Rossini R. 169  
Russo E. 189  
Russo T.P. 183

## S

Santaniello A. 183  
Scolamacchia F. 67  
Shtylla Kika T. 157  
Stefani E. 193  
Stella M.C. 61

## T

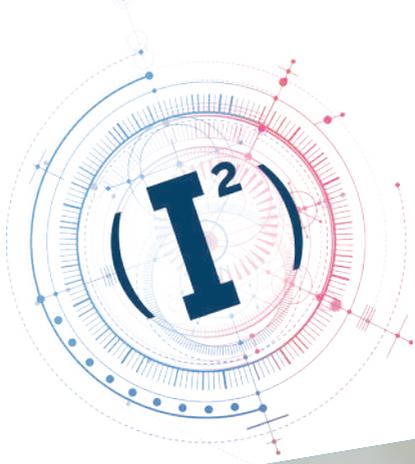
Terregino C. 67, 79, 205  
Tolosi R. 137  
Tomassone L. 61  
Tondo A. 83, 193  
Tonon E. 45, 127  
Tosi G. 97, 119, 169  
Trocino A. 137  
Tucciarone C.M. 109, 205  
Tugnoli B. 97

## V

Valastro V. 205  
Varriale L. 183  
Verin R. 67  
Viel L. 87

## Z

Zanardello C. 67, 79, 87  
Zandonà L. 45  
Zarpellon G. 45



**Elanco**



**MAXIBAN. LA SCELTA ELANCO, SENZA SORPRESE.**

**Elanco**

*Perchè rischiare, quando c'è*

**Maxiban™**

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



VACCINARE IL  
100%  
CONTINUO LA  
CUCULIONI  
E POSSIBILE

**EVANT**<sup>®</sup>

Con **HIPRAMUNE**<sup>®</sup> 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**<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>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 (23 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<sup>®</sup> contenente 7 ml (1.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE<sup>®</sup>T contenente 50 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT<sup>®</sup> contenente 35 ml (5.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE<sup>®</sup>T contenente 250 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT<sup>®</sup> contenente 70 ml (10.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE<sup>®</sup>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.**



LA GAMMA COMPLETA DI PRODOTTI HUVEPHARMA  
A ZERO GIORNI PER GALLINE OVAIOLE

Tylmasin®/Tylovet®

Tilosina

Oxi 50 Supersol®

Ossitetraciclina

Vetmulin®

Tiamulina

Amproline®

Amprolium

Paramore®

Amminosidina

Gallifen®

Fenbendazolo





Biofilm  
protettivo

- Una flora batterica positiva selezionata per formare un biofilm protettivo sulle superfici
- Un approccio complementare ai protocolli di igiene per la biosicurezza
- Crea un ecosistema microbico più equilibrato per produzioni zootecniche più sicure

Lalfilm PRO,  
per le superfici  
degli allevamenti



*Non tutti i prodotti sono disponibili in tutti i mercati,  
né le allegazioni che li riguardano sono consentite in tutte le regioni del mondo.*

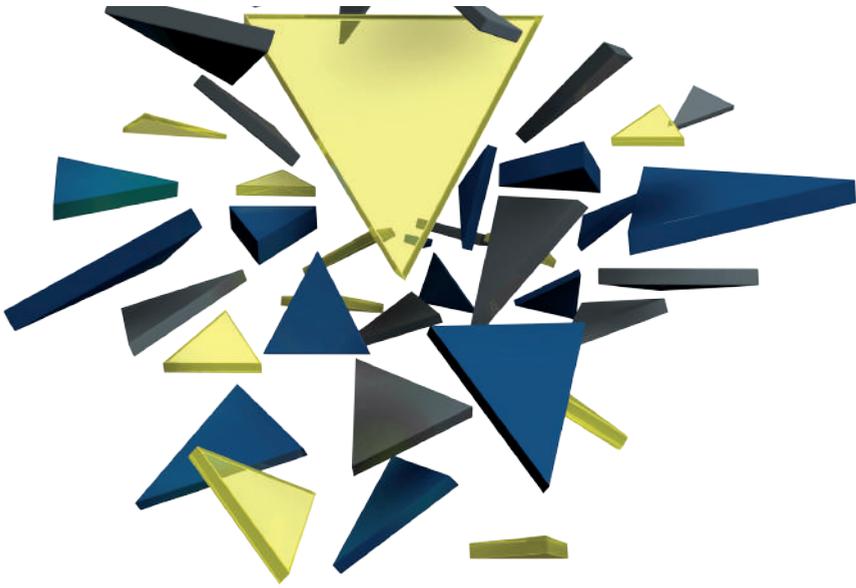
**LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS**

[www.lallemandanimalnutrition.com](http://www.lallemandanimalnutrition.com)

[animalitaly@lallemand.com](mailto:animalitaly@lallemand.com)

+39 327 4147662

**LALLEMAND**



# Exzolt®

## FLURALANER

Exzolt rappresenta l'approccio innovativo e rivoluzionario per la gestione completa delle infestazioni da pidocchio rosso nell'allevamento avicolo, esplicando 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 illustrato. **222**

**POULVAC<sup>®</sup>**

E. coli

**PER I TUOI ANIMALI  
PER LA SALUTE  
PER TE**



**zoetis**

Novembre 2020  
da Litografia La Ducale Srl - Parma

